

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica



**NUEVOS DERIVADOS DE 4H-PIRAN-4-ONA INHIBIDORES
DE LA PROTEÍNA RAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María del Carmen Piñar Pinedo

Bajo la dirección de los doctores
M^a Luz López Rodríguez
Alma Viso Beronda

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2667-4

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



**NUEVOS DERIVADOS DE 4H-PIRAN-4-ONA INHIBIDORES DE LA
PROTEÍNA RAS**

Memoria que para optar al título de
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS
presenta
María del Carmen Piñar Pinedo

MADRID
8 de Junio de 2004

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, gracias al proyecto de I+D financiado por la empresa Exonhit Therapeutics, S. A.

*El tema ha sido propuesto y dirigido por las **Profesoras Dra. M^a Luz López Rodríguez y Dra. Alma Viso Beronda**, a quienes deseo expresar mi agradecimiento.*

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento:

Al Departamento de Investigación de Exonhit Therapeutics, S. A., por la realización de las pruebas biológicas.

Al Profesor Dr. Leonardo Pardo, a la Profesora Dra. Mercedes Campillo y a la Dra. Arantxa Sanz, del Laboratorio de Medicina Computacional de la Unidad de Bioestadística de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, por su valiosa ayuda en la realización de los estudios de relación estructura-actividad y simulación computacional.

Al Dr. Jesús Jiménez-Barbero, del Centro de Investigaciones Biológicas, por su acogida y todas sus enseñanzas en los estudios de resonancia magnética nuclear.

A la Profesora Dra. M^a José Morcillo, por su constante y continuo apoyo y su gran ejemplo tanto dentro del laboratorio como fuera de él, y a la Dra. Bellinda Benhamú.

Agradecimientos

Al Profesor Dr. Diego Armesto Vilas por su admisión en el Departamento de Química Orgánica I de la UCM. Así como al actual Director del Departamento, Dr. Joaquín Plumet Ortega, por admitir la presentación de esta Tesis Doctoral. Asimismo, quiero agradecer a Soledad Martínez Real, Secretaria del Departamento, su inestimable ayuda a lo largo de estos años.

Al Profesor Dr. Miguel Ángel Sierra, a la Dra. María José Mancheño, a la Profesora Dra. Mar Gómez y al Dr. Santiago Romano, con quienes emprendí mis primeros pasos en la investigación.

A los Doctores del CAI de Resonancia Magnética Nuclear Lola Molero Vilchez, Ángel Sánchez Vázquez y Elena Sáez Barajas, quienes siempre me han echado una mano con la “reso”.

A todos mis compañeros de laboratorio a lo largo de todo este tiempo, Juan Carlos, Israel, Pedro, María Jesús, Silvia, Esther, Isabel, Roci, Eugenia, Mariola, Paulita, Tania, Ángel, Rocío, Elena, Marga; y, de manera muy especial a Paloma y a Nuria, quienes han participado en la síntesis de algunos de los productos que aquí se describen. A los compañeros de “pasillo”, Marcris, Salvatore, María, Alex, Marga, Elsa, Carolina, Cristina, Ana, Beatriz, Charito, Susi... por su apoyo y ánimo constantes.

Y, cómo no, a mis padres y hermanos, a toda mi familia y a todos mis amigos, especialmente a Pablo Rico, Carola Larios, AdaraRuiz de la Escalera y María Marco.

Madrid, Junio de 2004

Abreviaturas y acrónimos

A:	Absorbancia.
Ac:	Acuoso.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
AK:	Ácido kójico.
Akt:	También denominada PKB, proteína quinasa B.
ARN:	Ácido ribonucleico.
ATP:	Adenosina-5'-trifosfato.
CAAX:	Extremo carboxi-terminal de las proteínas p21 Ras; C es la cisteína 186, AA dos aminoácidos alifáticos y X un aminoácido neutro.
CAIs:	Familia de compuestos derivados de carboxamido-amino-imidazol.
ccf:	Cromatografía en capa fina.
CI ₅₀ :	Concentración inhibitoria 50.
CIM:	Crecimiento celular independiente de matriz (<i>anchorage independent growth</i>).
CoMFA:	Análisis comparativo del campo molecular (<i>comparative molecular field analysis</i>).
COSY:	Espectro 2D de correlación de los desplazamientos de ¹ H basado en la conectividad a través de enlaces (<i>correlated spectroscopy</i>).
DCC:	Diciclohexilcarbodiimida.
DMAP:	Dimetilaminopiridina.
DMF:	Dimetilformamida.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
EGFR:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>).
Eq:	Equivalente.
ERBB2:	Receptor del factor de crecimiento similar a EGFR también conocido como HER2/neu.
Erk:	Quinasas reguladas por señales extracelulares (<i>extracellular signal-regulated kinases</i>).
FTasa:	Enzima farnesil transferasa.
GAP:	Proteínas que activan la capacidad GTPasa de las proteínas G.
GDP:	Guanosina-5'-difosfato.
GEF:	Factores de intercambio del nucleótido de guanina (<i>guanine exchange factors</i>).
GGTasa:	Enzima geranilgeranil transferasa.
Grb2:	Proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento (<i>growth-factor-receptor-bound protein 2</i>).
GTP:	Guanosina-5'-trifosfato.
GTPasa:	Enzima que cataliza la hidrólisis de GTP.
H460:	Línea celular tumoral de carcinoma de pulmón.
HCT116:	Línea celular tumoral de adenocarcinoma de colon.
HER2:	Factor de crecimiento epitelial humano (<i>human epitelial growth factor receptor</i>).
HMBC:	Espectro de correlación ¹ H- ¹³ C a larga distancia (<i>heteronuclear multiple-bond correlation</i>).

HMQC:	Espectro de correlación ^1H - ^{13}C a un enlace (<i>heteronuclear multiple-quantum correlation</i>).
IFT:	Inhibidores de la enzima farnesil transferasa.
IGF-1R:	Subtipo 1 del receptor del factor de crecimiento insulina.
MAPK:	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPKK:	Quinasas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinase kinases</i>), también denominadas MEK.
mARN:	ARN mensajero.
MCF10A:	Línea celular no tumoral de mama.
MCF7:	Línea celular tumoral de carcinoma de mama.
MDA231:	Línea celular tumoral de carcinoma de mama.
MRC5:	Línea celular no tumoral de mama.
MTT:	Método basado en el empleo de sales de tetrazolio utilizado para medir la citotoxicidad de los compuestos (<i>thiazolyl blue tetrazolium bromide</i>).
NIH3T3:	Línea celular no tumoral de fibroblastos de ratón.
NMP:	<i>N</i> -metilpirrolidinona.
NOESY:	Espectro 2D de correlación de los desplazamientos de ^1H basado en el efecto nuclear Overhauser (<i>NOE spectroscopy</i>).
PDB:	Banco de datos de proteínas (<i>protein data bank</i>).
PK1:	Proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítido (<i>3-phosphoinositide-dependent kinase-1</i>).
PI(3)K:	Quinasa 3-fosfoinositidínol (<i>phosphoinositide 3-kinase</i>).
PLS:	Mínimos cuadrados parciales (<i>partial least square</i>).
PPF:	Pirofosfato de farnesilo.
PTK:	Proteínas tirosina quinasa.
PTSA:	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico.
QSAR:	Relación cuantitativa estructura-citotoxicidad (<i>quantitative structure activity relationship</i>).
RalGDS:	Factores de intercambio de nucleótido de guanina de Ral.
RBD:	Dominio de unión de Ras (<i>Ras binding domain</i>).
RMN:	Resonancia magnética nuclear.
SH:	Dominio de homología Src (<i>Src homology</i>).
SH2:	Dominio de homología Src 2.
SH3:	Dominio de homología Src 3.
Shc:	Dominio que contiene una región SH2 (<i>SH2 containing domain</i>).
S _N 2:	Sustitución nucleófila bimolecular.
Src:	Proteína quinasa.
STD:	Experimento de diferencia de saturación (<i>saturation transfer difference</i>).
TBSCl:	Cloruro de <i>t</i> -butildimetilsililo.
THF:	Tetrahidrofurano.
Tr-NOE:	Efecto Overhauser nuclear transferido (<i>transferred NOE</i>).
VEGFR:	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular.

1. Introducción	1
2. Objetivos	13
3. Antecedentes	17
3.1. Señalización celular mediada por Ras	19
3.2. Dianas terapéuticas y moléculas citotóxicas que intervienen en la vía Ras	27
3.3. Caracterización estructural de las proteínas p21 Ras	44
4. Resultados y discusión	53
4.1. Síntesis de los nuevos derivados de estructura general I	55
4.2. Determinación de la capacidad citotóxica de los compuestos obtenidos en diferentes líneas celulares	75
4.3. Relación estructura-citotoxicidad: Análisis comparativo del campo molecular (QSAR-3D/CoMFA)	80
4.4. Validación del modelo CoMFA mediante el diseño y la síntesis de nuevos compuestos	96
4.5. Caracterización del complejo compuesto 8z (EHT0229) -proteína Ras mediante resonancia magnética nuclear y simulación molecular	104
5. Parte experimental	117
5.1. Síntesis de los 2-alilfenoles 2a-d y de los 2-propilfenoles 3a-d	120
5.2. Síntesis de los aril bromoalquil éteres 4a-m	127
5.3. Síntesis de 3-hidroxi-6-(hidroximetil)-2-[(1 <i>E</i>)-prop-1-enil]-4 <i>H</i> -piran-4-ona, 6	134
5.4. Síntesis de las 5-bromopentiloxi-4 <i>H</i> -piran-4-onas, 7a,b	136
5.5. Síntesis de las hidroximetil-4 <i>H</i> -piran-4-onas, 8a-dd	138
5.6. Síntesis de ésteres, 9a-f	170
5.7. Síntesis de carbamatos, 10a-e	177

Índice

5.8. Síntesis de benciléteres, 11a-c	184
5.9. Síntesis de acetales, 12c,d	187
5.10. Síntesis de aminas, 13b-f	191
5.11. Síntesis de ácidos, 14a-k y de la amida 15	198
5.12. Síntesis del compuesto de referencia para los ensayos biológicos, 5-amino-1-[4-(4-clorobenzoil)-3,5-diclorobencil]- 1,2,3-triazol-4-carboxamida (L-651,582).....	211
6. Conclusiones	217

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad tan antigua como el hombre mismo, temida por la sociedad y científicamente apasionante.

La palabra cáncer (del griego karkinoma y del latín cancer, -cri) se emplea de manera genérica para denominar a un grupo de más de cien enfermedades diferentes, con más de mil variantes histopatológicas, que sólo comparten como característica común una proliferación celular anormal y descontrolada. Este conjunto de enfermedades es hoy en día la segunda causa de muerte en los países desarrollados, en los que una de cada tres personas padece un tipo de cáncer y una de cada cinco fallece a causa de la enfermedad¹.

Durante el siglo XX la importancia del cáncer aumentó debido al descenso de las muertes por enfermedades infecciosas, a la mejora de las condiciones de higiene y al descubrimiento de los antibióticos. Por otro lado, el aumento de la esperanza de vida media de la población, y el hecho científicamente probado de que el riesgo de desarrollar un cáncer aumenta con la edad, son también factores a tener en cuenta a la hora de evaluar la importancia de este conjunto de enfermedades.

Gracias a los grandes descubrimientos de las últimas décadas en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares de los procesos tumorales, cada día se conocen tratamientos más eficaces y selectivos para erradicar esta enfermedad. Si además tenemos en cuenta los grandes avances en el desarrollo de las técnicas de detección y diagnóstico de tumores, podemos empezar a mirar al futuro de manera más esperanzadora.

¹ (a) Edwards, B. K.; Howe, H. L.; Ries, L. A. G.; Thun, M. J.; Rosenberg, H. M.; Yancik, R.; Wingo, P. A.; Jemal, A.; Feigal, E. G., *Cancer*, **2002**, 2766. (b) Muñoz, A.; Cáncer, Genes y Nuevas Terapias. Ed. Hélice, **1997**.

El desarrollo de un tumor tiene su origen en una única mutación de una sola célula del cuerpo. Generalmente, cualquier mutación celular se corrige *in situ* por determinados complejos enzimáticos. Si dichos mecanismos de reparación del ADN no funcionan adecuadamente la célula mutada debe entrar en apoptosis. Cuando los mecanismos de reparación y los de entrada en apoptosis se encuentran alterados empieza a reproducirse la célula tumoral sin control alguno (Figura 1.1).

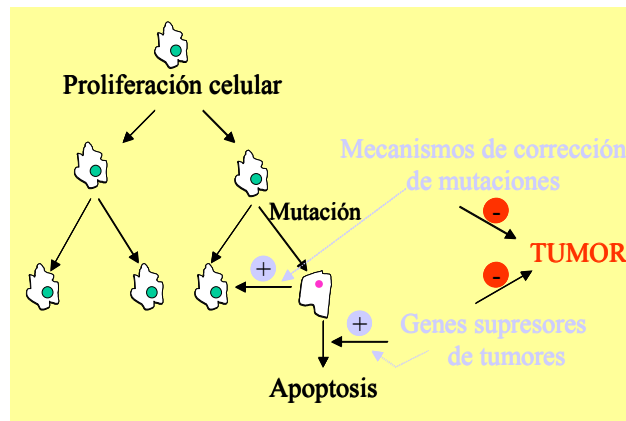


Figura 1.1.

Control de la proliferación celular.

Cada vez que se divide una célula mutada lo hará de manera más rápida y menos diferenciada, generando en su descendencia un cúmulo de errores que la harán más resistente a los mecanismos de defensa naturales. De esta manera se volverán inmortales, reproduciéndose indefinidamente y ocupando un espacio cada vez mayor. Si dicha célula mutada y su descendencia no son capaces de invadir tejidos circundantes hablamos de tumores benignos, que con cirugía se pueden extirpar sin más complicación que la del lugar en el que se encuentren (Figura 1.2).

Cada nueva mutación confiere a las células una menor diferenciación y también una menor superficie de contacto, por lo que al dividirse de manera continua pueden empezar a invadir los tejidos más cercanos, e incluso otros distantes entrando en los torrentes sanguíneo o linfático, hasta que una de las células sea capaz de resistir al sistema inmunitario y transportarse por el torrente hasta dar con un órgano diana, dónde se establece y se sigue

reproduciendo. Estos tumores invasivos son los que originan los procesos metastásicos y se conocen como tumores malignos (Figura 1.3).

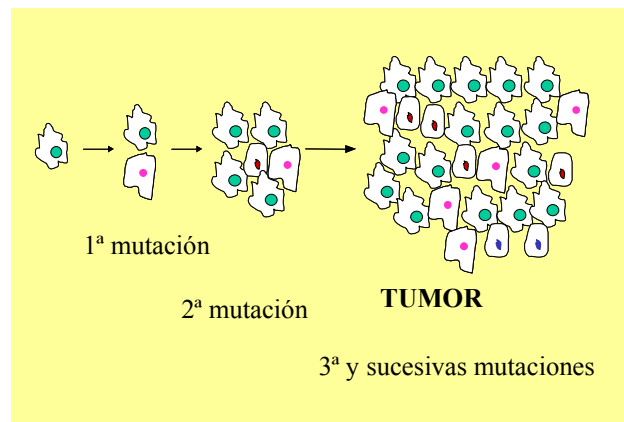


Figura 1.2.

Formación de un tumor.

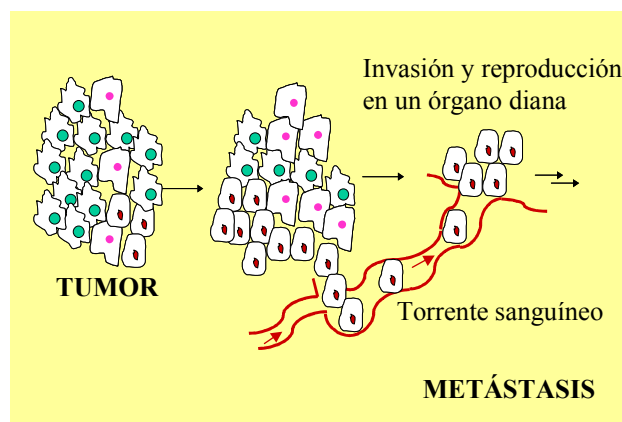


Figura 1.3.

Desarrollo de una metástasis.

Una de las aproximaciones terapéuticas más prometedoras, y con mayor impacto en la investigación actual del cáncer, es el estudio de los mecanismos bioquímicos a través de los cuales se transmite la información en las células. El conocimiento de las vías de señalización celular, en particular de los procesos de transducción de la señal mitogénica desde la membrana plasmática hasta el núcleo celular y de cómo estas cascadas están alteradas en las células tumorales, es la base fundamental para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y, también, para el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos.

Unas de las moléculas señalizadoras más importantes que regulan los procesos de crecimiento, diferenciación y proliferación celular son los denominados factores de crecimiento. Cuando estos factores interaccionan con sus receptores celulares se desencadenan todas las cascadas de señalización implicadas. Así, las señales de crecimiento celular atraviesan la bicapa lipídica hasta llegar al interior del núcleo, transmitiéndose por el citoplasma a través de diversas moléculas, generalmente proteínas, que se activan y desactivan fundamentalmente por procesos de fosforilación / desfosforilación a modo de interruptores. Finalmente, la información llega al núcleo, donde se activan los factores de transcripción que ponen en marcha el ciclo de división celular (Figura 1.4).

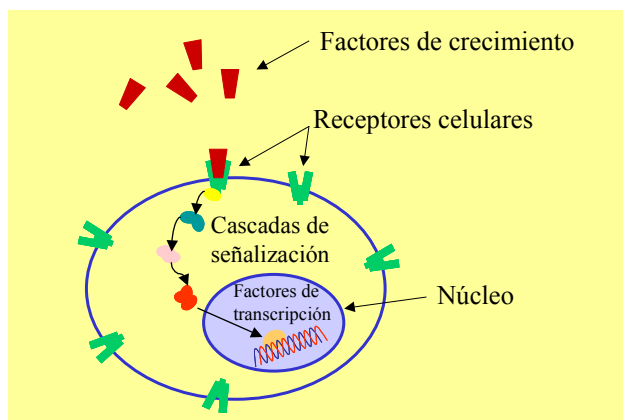


Figura 1.4.

Esquema de señalización celular.

En la actualidad, se sabe que algunas proteínas que actúan en las cascadas de señalización celular son sintetizadas a partir de genes denominados protooncogenes. La estabilidad génica de éstos es vital para el funcionamiento de los organismos; así, cuando se producen en ellos determinadas mutaciones dan lugar a proteínas capaces de desarrollar procesos tumorales, denominándose entonces oncogenes.

A mediados de la década de los sesenta Harvey² y Kirsten³ descubrieron una familia de oncogenes que presentaba una elevada conservación en todas las especies que procedían de los protooncogenes ras (*rat sarcoma*). Desde entonces y hasta nuestros días, el estudio de las bases moleculares de los distintos procesos neoplásicos ha puesto de manifiesto, de forma reiterativa, la existencia de alteraciones en dichos genes⁴. A comienzos de la década de los ochenta ya se observó que cerca de un 30 % de los tumores sólidos en humanos presentaban, al menos, una mutación en ras⁵.

Hoy en día, la familia de genes ras se puede clasificar en al menos cinco subfamilias. Todos los genes de esta familia codifican proteínas GTPasas monoméricas, que se denominan proteínas Ras/Rap, Rac/Rho, Rab, Ran, Arf y RJs⁶. La subfamilia de protooncogenes ras está compuesta por tres tipos diferentes de genes: H-, K- y N-ras⁷, que codifican proteínas G monoméricas de unos 21.000 daltons, denominadas p21 Ras. En estos tres tipos de genes hay un gran número de similitudes, aunque existen algunas diferencias entre ellos en cuanto a su localización subcelular y las vías de procesamiento de sus proteínas producto.

² Harvey, J. J., *Nature*, **1964**, 204, 1104.

³ Kirsten, W. H.; Mayer, L. A., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1967**, 39, 311.

⁴ Barbacid. M., *Ann. Rev. Biochem.*, **1987**, 56, 779.

⁵ Santos, E.; Fernández Medarde, A., *¿Qué es el Cáncer?*, en 50 Años de ADN. La Doble Hélice. García Barreno, P., Ed. Espasa, **2003**, Cap 8, 269.

⁶ (a) Krauss, G., *Signal Transmission via Ras Proteins*, en Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, 2ª Ed., Wiley-VCH Verlag, **2001**, Cap 9, 324. (b) Nepomuceno-Silva, J. L.; de Melo, L. D. B.; Mendonça, S. M.; Paixão, J. C.; Lopes, U. G., *Gene*, **2004**, 327, 221.

⁷ Watzinger, F.; Lion, T., *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, March **1999**, <http://infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/ras.html>

Las proteínas Ras son capaces de unirse a nucleótidos de guanina⁸, presentan una capacidad GTPasa intrínseca⁹ y su correcto funcionamiento está directamente relacionado con su asociación a la membrana plasmática¹⁰. En todos los organismos eucariotas estas proteínas altamente conservadas actúan como centrales de transducción intracelular. Su importancia radica en que a través de estas centrales se reciben, modulan y transmiten las señales que controlan un gran número de procesos celulares como los de crecimiento, diferenciación, transformación y apoptosis¹¹.

Así, cuando una célula normal sufre una mutación en ras pierde el control de muchas de estas funciones y se hace independiente de los factores de crecimiento e insensible a sus señales inhibitorias, siendo capaz de dividirse ilimitadamente y metastatizar, invadiendo los tejidos más cercanos, los vasos sanguíneos y algunos órganos distantes, además de estimular la angiogénesis e inhibir la apoptosis¹².

En la actualidad, un gran número de terapias antitumorales están orientadas a inhibir las alteraciones en el funcionamiento de las proteínas Ras, debido a su gran incidencia en un elevado número de procesos neoplásicos (Tabla 1.1)¹³.

⁸ (a) Scolnick, E. M.; Papageorge, A. G.; Shih, T. Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1979**, 76, 5355. (b) Shih, T. Y.; Papageorge, A. G.; Stokes, P. E.; Weeks, M. O.; Scolnick, E. M., *Nature*, **1980**, 287, 686. (c) Tamanoi, F.; Walsh, M.; Kataoka, T.; Wigler, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 6924. (d) Temeles, G. L.; Gibbs, J. B.; D'Alonzo, J. S.; Sigal, I. S.; Scolnick, E. M., *Nature*, **1985**, 313, 700.

⁹ (a) Véase la referencia 8d. (b) Gibbs, J. B.; Sigal, I. S.; Poe, M.; Scolnick, E. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 5704. (c) McGrath, J. P.; Capon, D. J.; Gooddle, D. V.; Levinson, A. D., *Nature*, **1984**, 310, 644. (d) Sweet, R. W.; Yokoyama, S.; Kamata, T.; Feramisco, J. R.; Rosenberg, M.; Gross, M., *Nature*, **1984**, 311, 273. (e) Manne, V.; Bekesi, E.; Kung, H. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 376.

¹⁰ (a) Willingham, M. C.; Pastan, I.; Shih, T. Y.; Scolnick, E. M., *Cell*, **1980**, 19, 1005. (b) Willumsen, B. M.; Christensen, A.; Hubbert, N. L.; Papageorge, A. G.; Lowy, D. R., *Nature*, **1984**, 310, 583. (c) Fujiyama, A.; Tamanoi, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, 83, 1266.

¹¹ (a) Véase la referencia 4. (b) Shields, J. M.; Pruitt, K.; McFall, A.; Shaub, A.; Der, C. J., *Trends in Cell Biol.*, **2000**, 10, 147. (c) Downward, J., *Nature Rev. Cancer*, **2003**, 3, 11.

¹² González de Buitrago, J. M.; Medina Jiménez, J. M., *Patología Molecular*, McGraw-Hill Interamericana, **2001**.

¹³ Véase la referencia 11c.

Tabla 1.1. Incidencia de mutaciones en los protooncogenes ras en diferentes procesos tumorales. Entre paréntesis se indica cuál de los tres genes ras se encuentra activado en cada caso.

Tipo de tumor	Frecuencia (%)	Tipo de tumor	Frecuencia (%)
Páncreas	90 (K)	Tiroides (folicular)	55 (H, K, N)
Adenocarcinoma de pulmón	35 (K)	Tiroides (papilar no diferenciado)	60 (H, K, N)
Colorrectal	45 (K)	Hígado	30 (N)
Melanoma	15 (N)	Riñón	10 (H)
Vejiga	10 (H)	Síndrome mielodisplásico	40 (K, N)
Seminoma	45 (K, N)	Leucemia mieloide aguda	30 (N)

Por otro lado, alteraciones en cualquier proteína perteneciente a la vía de señalización Ras también pueden modificar los procesos de proliferación celular. Así, tanto la sobre expresión de ciertos receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa, principalmente EGFR (*epithelial growth factor receptor*), y ERBB2 (receptor del factor de crecimiento similar a EGFR, también conocido como HER2/neu), como la mutación o amplificación de los efectores de Ras, como Braf y PI(3)K, parecen jugar un papel relevante en la activación de la vía de señalización de la proteína Ras. Estas alteraciones están implicadas en distintos tipos de tumores (Tabla 1.2)¹⁴.

Tabla 1.2. Incidencia de alteraciones en algunas proteínas de la cascada de la vía Ras en el desarrollo de diferentes tumores.

Alteraciones	Tipo de tumor	Frecuencia (%)
Sobre expresión de EGFR	Carcinomas de diferentes tipos	>50
Amplificación de ERBB2	Mama	30
Mutación en Braf	Melanoma	66
	Colorrectal	12
Amplificación de PI(3)K	Ovario	40

¹⁴ Véase la referencia 11c.

En la actualidad el conocimiento de las vías de señalización de la proteína Ras ha permitido el desarrollo de nuevos antitumorales que, aunque no actúan directamente sobre la proteína Ras, son agentes citotóxicos mucho más específicos y selectivos que los fármacos desarrollados hasta el momento. Estos compuestos son capaces de inhibir el desarrollo tumoral interfiriendo fundamentalmente en las cascadas de señalización del ciclo celular y en la angiogénesis. Fármacos como Herceptina, Iressa y Cetuximab, inhibidores de EGFR, se están usando en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, pulmón, colon, cabeza y cuello. Otras terapias se han dirigido a interrumpir las cascadas de señalización mediante el diseño de inhibidores de enzimas, la farnesiltransferasa por ejemplo. Dentro de estos inhibidores cabe destacar compuestos como Zarnestra o Sarasar, que se encuentran en fases de ensayo clínico avanzadas para el tratamiento de tumores sólidos. En este contexto de interrupción de la señalización intracelular, encontramos el Gleevec, uno de los fármacos más atractivos en la actualidad, que presenta excelentes resultados en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de una gran variedad de tumores¹⁵.

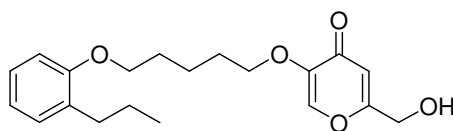
Por tanto, una vez conocidas la enorme incidencia de los procesos tumorales en nuestra sociedad y las posibles ventajas de interaccionar en la vía de señalización de Ras, en nuestro grupo de investigación, en colaboración con los laboratorios Exonhit Therapeutics, nos planteamos la búsqueda y el desarrollo de nuevos compuestos con propiedades antitumorales capaces de actuar sobre la proteína Ras.

Mediante cribado (*screening*) de librerías se identificó el compuesto **EHT0459**, el cual presentó moderados valores de citotoxicidad ($CI_{50} = 30\text{-}50\ \mu\text{M}$) en cuatro líneas celulares tumorales [H460 (carcinoma de pulmón), HCT116 (adenocarcinoma de colon), MDA231 y MCF7 (carcinomas de mama)]. Aunque **EHT0459** no mostró una elevada selectividad sobre células no tumorales MCF10A, ni tampoco era capaz de inhibir la migración celular; sin embargo, sí inhibía el crecimiento independiente de matriz (CIM) en dos soportes diferentes y se comprobó que su perfil antitumoral era debido a su acción sobre la proteína Ras, como indicaba su capacidad para inhibir la proliferación de células transfectadas con dicha proteína constitutivamente activada mediante la introducción de un residuo de valina en

¹⁵ Véase la referencia 5.

posición 12 (Tabla 1.3), resultado de interés para la realización del trabajo que presentamos. Así, **EHT0459** representa un nuevo cabeza de serie en el desarrollo de nuevos compuestos capaces de inhibir la activación de la proteína Ras.

Tabla 1.3. Datos biológicos del compuesto cabeza de serie **EHT0459**.



EHT0459

Citotoxicidad (CI ₅₀ μM)					Migración	CIM (μM)	Test Ras-Val12
H460	HCT116	MDA231	MCF7	MCF10A			
40	35	50	30	50	-	4 < CI ₅₀ < 5 (matrigel) 25 (agar)	+

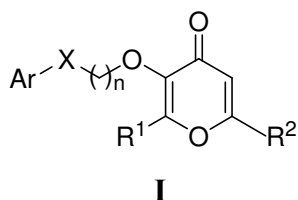
2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

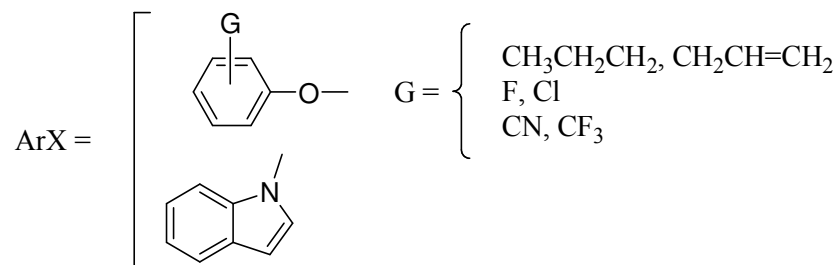
El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de nuevos compuestos derivados de 4*H*-piran-4-ona con propiedades antitumorales capaces de inhibir la señalización de la proteína Ras.

Para lograr este objetivo se han llevado a cabo las siguientes etapas:

1. Síntesis de nuevos derivados de 4*H*-piran-4-ona definidos por la estructura general **I**.



Donde:



$n = 5-7$

$\text{R}^1 = \text{H}, \text{CH}_3\text{CH=CH}$

$\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{OH}, \text{CH}_2\text{-O-COR}^3, \text{CH}_2\text{-O-CONHR}^4, \text{CH}_2\text{-OR}^5,$
 $\text{CH}_2\text{-O-CH(R}^6\text{)-OCH}_3, \text{CH}_2\text{NR}^7\text{R}^8, \text{COOH}, \text{CONHR}^9$

(R^{3-9} son grupos alifáticos y aromáticos sencillos)

2. Determinación de la capacidad citotóxica de los compuestos obtenidos en diferentes líneas celulares tumorales.

3. Estudios de la relación estructura actividad (QSAR-3D) mediante la metodología del análisis comparativo del campo molecular (CoMFA).

4. Validación del modelo CoMFA mediante el diseño y la síntesis de nuevos compuestos.

5. Caracterización del complejo ligando-proteína Ras mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y simulación computacional.

3. ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

3.1 SEÑALIZACIÓN CELULAR MEDIADA POR RAS

El proceso de señalización celular consiste en la transmisión de información desde el exterior de una célula hasta su núcleo. Dicha señalización transcurre a través de factores de crecimiento, receptores de membrana y un gran número y variedad de proteínas. En este contexto, las proteínas p21 Ras realizan una función esencial en los procesos de señalización, debido a que transmiten y amplifican las señales transmembrana, regulan la síntesis de proteínas, guían el tráfico vesicular por el citoplasma y controlan la proliferación y diferenciación celular, actuando como interruptores celulares¹⁶.

Al igual que la gran mayoría de las proteínas con actividad GTPasa, las proteínas Ras se unen a GDP o GTP siguiendo el ciclo de activación / desactivación mostrado en la Figura 3.1. En las células normales las proteínas p21 Ras se encuentran inactivas, unidas a GDP en el citosol¹⁷. Su activación está controlada por determinados factores de crecimiento que transmiten su señal a través de los receptores celulares de membrana. Así, tras la interacción con proteínas adaptadoras como Shc (*SH2 containing domain*) y Grb2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*), y con los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs, *guanine exchange factor*, reguladores positivos)¹⁸, las proteínas Ras se unen a GTP cambiando su conformación e interaccionando de manera más específica con sus moléculas efectoras, desencadenando un gran número de rutas celulares complejas interrelacionadas entre sí.

¹⁶ Bourne, H. R.; Sanders, D. A.; McCormick, F., *Nature*, **1991**, 349, 117.

¹⁷ Khosravi-Far, R.; Der, C. J., *Cancer Metastasis Rev.*, **1994**, 13, 67.

¹⁸ Satoh, T.; Karizo, Y., *Semin. Cancer Biol.*, **1992**, 3, 169.

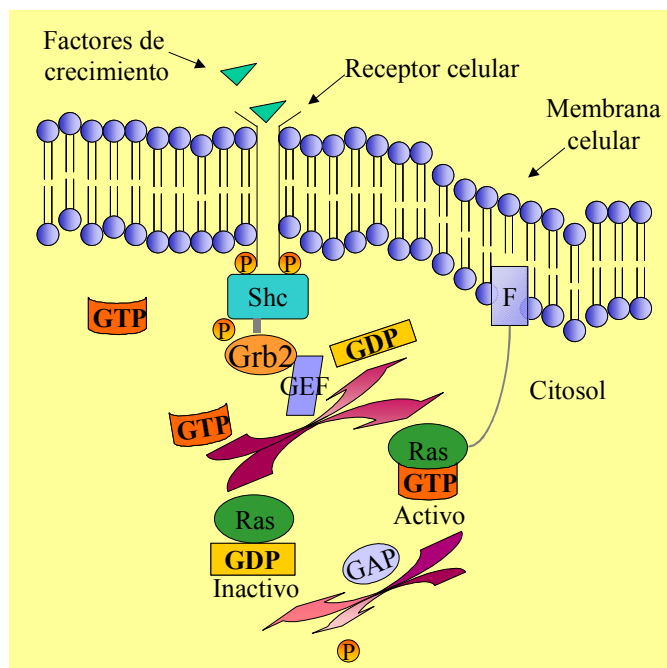


Figura 3.1.

Ciclo de activación / desactivación de las proteínas p21 Ras. GEF son los factores de intercambio de nucleótido de guanina; GAP son las proteínas que incrementan la actividad GTPasa de las proteínas p21 Ras; P representa grupos fosfato y F un grupo farnesilo.

Se ha observado que las proteínas tirosina quinasa (PTK) son claves en la transducción de la señal inducida por los factores de crecimiento celular¹⁹. La mayoría de estas proteínas son capaces de transmitir las señales mitogénicas a través de los dominios SH (*Src homology*). En concreto, la activación de las proteínas p21 Ras está mediada por la unión de la proteína adaptadora Grb2, cuyo dominio SH2 (dominio de homología Src 2) reconoce los residuos de tirosina fosforilados bien en el receptor, o en proteínas adaptadoras como Shc²⁰. A su vez, Grb2 interacciona a través de su dominio SH3 (dominio de homología Src 3, capaz de unirse a zonas ricas en prolina) con los distintos GEFs, como por ejemplo Sos (*Drosophila son-of-sevenless*), que estimulan el intercambio de nucleótido de guanina.

¹⁹ Schlessinger, J.; Ullrich, A., *Neuron*, **1992**, 9, 383.

²⁰ McCormick, F., *Nature*, **1993**, 363, 15.

En el momento en el que dejan de recibirse señales de reproducción celular entran en acción las proteínas GAP (*GTPase activating proteins*, reguladoras negativas), que poseen actividad GTPasa y favorecen la hidrólisis de un grupo fosfato, es decir, la inactivación de las p21 Ras²¹. La importancia de las proteínas GAP se debe a que la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Ras aisladas es muy baja ($K_{\text{Hidrólisis-GTP}}$ del orden mmolar)²². Por otro lado, las proteínas Ras presentan una mayor afinidad por las moléculas de GTP, más abundantes que las de GDP en el citosol.

El balance entre las señales positivas y negativas es lo que determinará que cada célula se divida, se diferencie o entre en apoptosis.

En células tumorales con mutaciones en Ras este ciclo de regulación no está controlado, de manera que las proteínas p21 Ras pueden permanecer unidas a GTP indefinidamente, transmitiendo una señal constante de división celular; e incluso son capaces de activarse sin necesidad de señales de factores de crecimiento.

Por otro lado, la unión de nucleótidos de GTP a las proteínas p21 Ras no es suficiente para que éstas se activen. Se necesita, además, que dichas proteínas transloquen a la membrana plasmática para que se produzca el acercamiento a sus diferentes efectores y puedan actuar como interruptores moleculares²³. La unión de las proteínas p21 Ras activadas a la membrana plasmática transcurre mediante una modificación postranslacional que consta de cuatro etapas (Figura 3.2)²⁴.

1.- Farnesilación del último residuo de cisteína del extremo C-terminal, mediante la acción de una enzima farnesil transferasa (FTasa).

2.- Eliminación de los tres últimos aminoácidos, AAX (A representa aminoácidos alifáticos, mientras que X indica residuos de serina o treonina), mediante una endoproteasa específica.

3.- Carboximetilación de la cisteína farnesilada, mediante una proteína metil transferasa específica.

²¹ Ahmadian, M. R.; Wiesmuller, L.; Lautwein, A.; Bischoff, F. R.; Wittinghofer, A., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 16409.

²² Lenzen, C.; Cool, R. H.; Prinz, H.; Kuhlmann, J.; Wittinghofer, A., *Biochem.*, **1998**, 37, 7420.

²³ Kuhlmann, J.; Herrmann, C., *Topics in Current Chem.*, **2000**, 211, 61.

²⁴ Véase la referencia 6.

4.- Adicionalmente, se puede producir la unión de una o dos cisteínas próximas al extremo C-terminal a la membrana plasmática a través de cadenas hidrofóbicas como restos geranilgeranilo o palmitoilo, por la acción de las enzimas correspondientes.

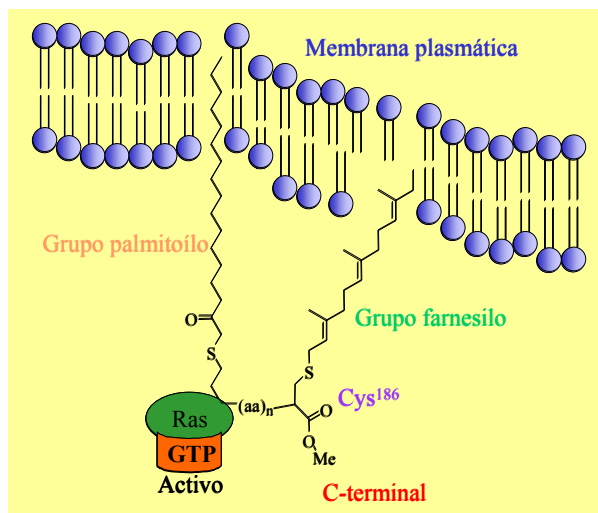


Figura 3.2.

Anclaje de las proteínas p21 Ras a la membrana plasmática.

Cuando las proteínas p21 Ras se unen a la membrana plasmática adoptan la conformación y posición adecuadas para interaccionar con sus distintos efectores. La unión con cada uno de ellos es en cada caso diferente y provoca la activación de distintas funciones celulares²⁵.

Los efectores más destacados de las proteínas p21 Ras se muestran en la Figura 3.3. Cada uno de ellos desencadena una cascada de reacciones que transmite una señal al núcleo celular. Todas las rutas celulares están, de alguna manera, relacionadas entre sí. El profundo conocimiento de cada una de las distintas cascadas, y de las interacciones que entre ellas se producen, permitirá diseñar fármacos cada vez más selectivos frente a las dianas terapéuticas de interés.

²⁵ Véase la referencia 23.

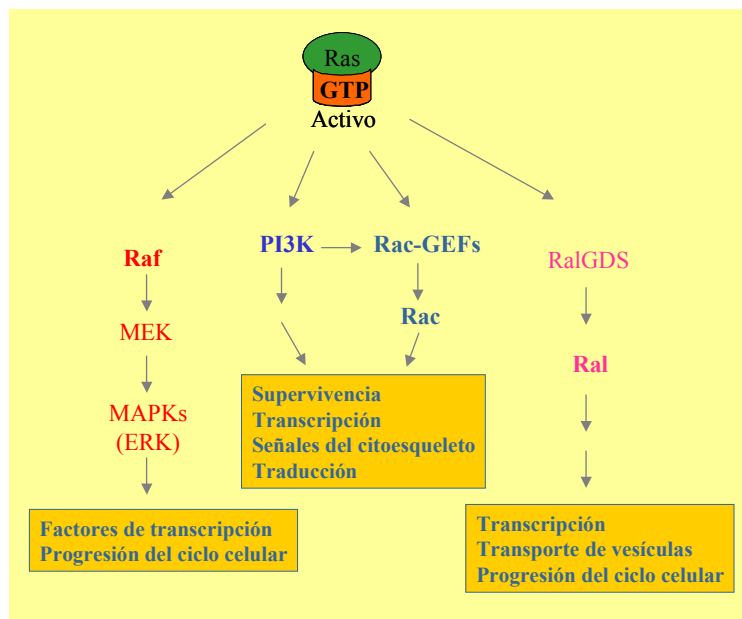


Figura 3.3.

Efectores más destacados de Ras.

Todos los efectores de Ras se caracterizan por su interacción dependiente de la unión previa de la proteína Ras con el nucleótido de GTP. A pesar de la gran cantidad de moléculas efectoras, en la actualidad no se conoce relación alguna entre ellas, no presentan homología en sus secuencias ni están relacionadas funcionalmente. Tampoco hay reglas en cuanto a la localización del dominio de unión con Ras en cada uno de los distintos efectores. Hasta la fecha, sólo se ha podido demostrar la activación por la acción directa de Ras de los tres efectores mostrados en la figura anterior (Figura 3.3), Raf, PI(3)K y RalGDS²⁶.

a) Raf

La interacción Ras / Raf es un punto crucial para la transcripción celular, por lo que hoy en día constituye uno de los grandes atractivos en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales.

²⁶ Véase la referencia 23.

En 1993 varios grupos de investigación descubrieron, de manera independiente, que Raf es un efector de Ras en mamíferos²⁷. Poco tiempo después se fueron encontrando más efectores de las proteínas p21 Ras pero, hasta el momento, Raf sigue siendo, con diferencia, el más importante de todos ellos.

Raf es una proteína quinasa específica de serina / treonina que fosforila, y por tanto activa, las quinasas MEK (también denominadas MAPKK, *mitogen-activated protein kinase kinases*), que a su vez fosforilan y activan a las proteínas Erk (*extracellular signal-regulated kinases*), amplificando así la señal. Las proteínas Erk, conocidas también como MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), desencadenan toda una cascada de fosforilaciones que acaba activando factores de transcripción nucleares como Elk, Fos o Jun.

A través de la unión con Ras-GTP, Raf es translocada a la membrana plasmática, donde se activa²⁸. Por otro lado, se ha estudiado la activación adicional de Raf mediante la fosforilación de residuos de tirosina específicos que se encuentran en la región central de las proteínas Raf²⁹.

b) PI(3)K

PI(3)K (*phosphoinositide 3-kinase*) es una enzima que interviene en la producción de moléculas que actúan como segundos mensajeros. Algunas isoformas de estas proteínas son heterodímeros que contienen una subunidad reguladora denominada p85; dos dominios de homología Src, SH2 y SH3, y una subunidad catalítica, p110. La subunidad p110 se activa por la acción de proteínas G heterotriméricas³⁰, o mediante su unión con proteínas Ras.

²⁷ (a) Vojtek, A. B.; Hollenberg, S. M.; Cooper, J. A., *Cell*, **1993**, 74, 205. (b) Zhang, X. F.; Settleman, J.; Kyriakis, J. M.; Takeuchi-Suzuki, E.; Elledge, S. J.; Marshall, M. S.; Bruder, J. T.; Rapp, U. R.; Avruch, J., *Nature*, **1993**, 364, 308. (c) Warne, P. H.; Vician, P. R.; Downward, J., *Nature*, **1993**, 364, 352. (d) Van Aelst, L.; Barr, M.; Marcus, S.; Polverino, A.; Wigler, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 6213.

²⁸ (a) Stokoe, D.; Macdonald, S. G.; Cadwallader, K.; Symons, M.; Hancock, J. F., *Science*, **1994**, 264, 1463. (b) Leivers, S. J.; Paterson, H. F.; Marshall, C. J., *Nature*, **1994**, 369, 411. (c) Suzuki, T.; Kurahashi, H.; Ichinose, H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2004**, 315, 389.

²⁹ (a) Marais, R.; Light, Y.; Paterson, H. F.; Marshall, C. J., *EMBO J.*, **1995**, 14, 3136. (b) Dent, P.; Reardon, D. B.; Morrison, D. K.; Sturgill, T. W., *Mol. Cell. Biol.*, **1995**, 15, 4125.

³⁰ Stoyanov, B.; Volinia, S.; Hanck, T.; Rubio, I.; Loubtchenkov, M.; Malek, D.; Stoyanova, S.; Vanhaesebroeck, B.; Dhand, R.; Nurnberg, B.; Gierschik, P.; Seedorf, K.; Hsuan, J. J.; Waterfield, M. D.; Wetzker, R., *Science*, **1995**, 269, 690.

La enzima PI(3)K está implicada en varios procesos celulares dependientes de Ras como la organización del citoesqueleto y la división celular.

Se ha observado, además, que PI(3)K puede actuar no sólo como efector de Ras, sino también antes de que se produzca la unión de Ras con GTP, lo cual hace que sea difícil investigar las consecuencias de la activación de esta enzima³¹.

c) RalGDS

RalGDS es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) de Ral, que a su vez es un efector de Ras³².

Ral es una proteína con actividad GTPasa relacionada con Ras, cuya activación transmite la señalización celular a la familia de proteínas Rho.

Por otro lado, los RalGDSs activan la transcripción celular de c-fos³³, vía de señalización poco conocida en la actualidad.

Como ejemplo de la enorme complejidad de cada una de las cascadas celulares desencadenadas por los distintos efectores de las proteínas p21 Ras, en la Figura 3.4 se han representado las vías de Raf y PI(3)K, que son las más estudiadas y mejor conocidas hasta el momento. Como se puede observar, tanto Raf como PI(3)K pueden también activarse de manera independiente de Ras.

³¹ Hu, Q.; Klippel, A.; Muslin, A. J.; Fantl, W. J.; Williams, L. T., *Science*, 1995, 268, 100.

³² (a) Kikuchi, A.; Demo, S. D.; Ye, Z-H.; Chen, Y-W.; Williams, L. T., *Mol. Cell. Biol.*, **1994**, 14, 7483. (b) Hofer, F.; Fields, S.; Schneider, C.; Martin G. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 11089. (c) Spaargaren, M.; Bischoff, J. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 12609.

³³ (a) White, M. A.; Vale, T.; Camonins, J. H.; Schaefer, E.; Wigler, M. H., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 16439. (b) Urano, T.; Emkey, R.; Feig, L. A., *EMBO J.*, **1996**, 15, 810. (c) Okazaki, M.; Kishida, S.; Hinoi, T.; Hasegawa, T.; Tamada, M.; Kataoka, T.; Kicuchi, A., *Oncogene*, **1997**, 14, 515.

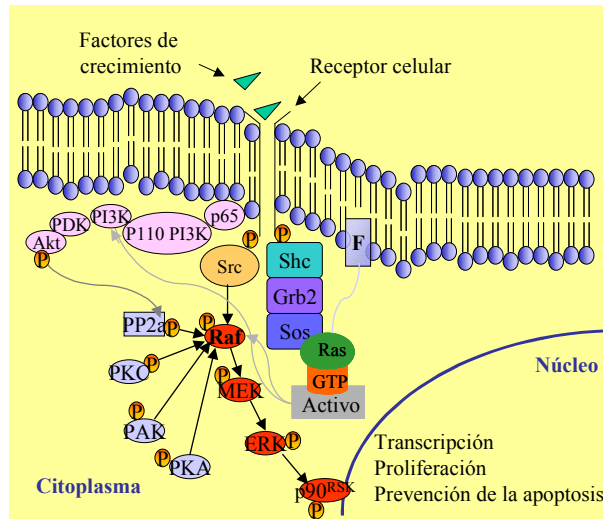


Figura 3.4.

Vías de señalización celular de los efectores de Ras: Raf y PI(3)K. Como se puede observar, en cada cascada dependiente de un efector de Ras interviene un gran número de moléculas señalizadoras que se van relacionando, de alguna manera, entre sí. Además, la activación de Raf y PI(3)K no sólo depende de la activación de Ras (flechas grises), si no que también se puede producir de manera independiente.

3.2. DIANAS TERAPÉUTICAS Y MOLÉCULAS CITOTÓXICAS QUE INTERVIENEN EN LA VÍA RAS

Las proteínas p21 Ras controlan directamente las cascadas de señalización claves para el crecimiento celular normal y, cuando no funcionan de manera adecuada, están implicadas en las transformaciones malignas³⁴.

Así, comparando el funcionamiento de las proteínas Ras en células normales frente a tumorales se observa que en las primeras existe un perfecto equilibrio, mientras que en las mutadas la velocidad de división es mucho mayor y pueden reproducirse de manera indefinida, hasta en ausencia de contacto con el sustrato; el crecimiento celular se desencadena con niveles notablemente inferiores de factores de crecimiento y las células hijas son cada vez más inmaduras, morfológicamente menos diferenciadas y con menor superficie de contacto³⁵.

La expresión continuada de los oncogenes ras mutados promueve varias de las características de las transformaciones tumorales, como el aumento de la proliferación celular, debido a la inducción de reguladores del ciclo celular, por ejemplo las ciclinas D1³⁶; la desensibilización para la apoptosis³⁷; mecanismos menos definidos en las cascadas dependientes de Ras³⁸; inducción de la angiogénesis y el aumento de la capacidad invasiva, lo que supone el desarrollo de metástasis³⁹.

Así, como se veía en el apartado anterior, una vez se conozcan a fondo las distintas rutas de señalización y las relaciones existentes entre ellas se podrán diseñar fármacos capaces de interaccionar de manera específica y selectiva con la diana terapéutica deseada.

³⁴ Véase la referencia 11c.

³⁵ Véase la referencia 5.

³⁶ (a) Yordi, J. S.; Muise-Helmericks, R. C., *Oncogene*, **2000**, *19*, 6503. (b) Pruitt, K.; Der, C. J., *Cancer Lett.*, **2001**, *171*, 1.

³⁷ Datta, S. R.; Brunet, A.; Greenberg, M. E., *Genes Dev.*, **1999**, *13*, 2905.

³⁸ (a) Rodríguez-Viciano, P.; Warne, P. H.; Dhand, R.; Vanhaesebroeck, B.; Gout, I.; Fry, M. J.; Waterfield, M. D.; Downward, J., *Nature*, **1994**, *370*, 527. (b) Pacold, M. E.; Suire, S.; Perisic, O.; Lara-González, S.; Davis, C. T.; Walker, E. H.; Hawkins, P. T.; Stephens, L.; Eccleston, J. F.; Williams, R.L., *Cell*, **2000**, *103*, 931.

³⁹ Véase la referencia 36a.

En la Figura 3.5 están esquematizadas las posibles dianas de la vía de señalización Ras que son, por orden de actuación en la cascada, los estímulos externos, los distintos receptores celulares, las propias proteínas p21 Ras, sus múltiples efectores, la cascada de quinasas dependiente de Ras / Raf y, por último, los factores de transcripción.

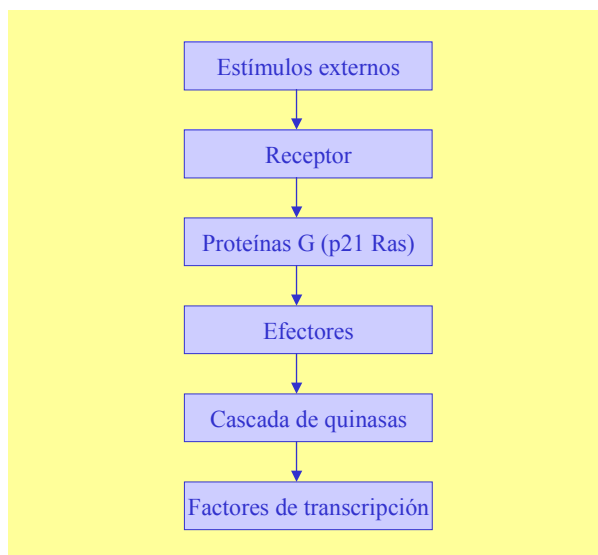


Figura 3.5.

Dianas terapéuticas de la vía de señalización Ras.

Las aproximaciones terapéuticas derivadas del estudio de estas dianas más desarrolladas en la actualidad son las siguientes:

- Activación / desactivación de las proteínas p21 Ras.
- Inhibición del anclaje de las proteínas Ras a la membrana plasmática.
- Inhibición de la unión de las proteínas Ras con sus distintos efectores.
- Inhibición de las proteínas quinasas de la ruta anterior a Ras.

Así, como se describe a continuación, la búsqueda de nuevos agentes con capacidad citotóxica está siendo encaminada, de manera persistente, hacia estos cuatro objetivos.

3.2.2. Inhibición del anclaje de la proteína Ras a la membrana plasmática

Como se ha descrito en el apartado 3.1, la unión a la membrana plasmática transcurre a través de un proceso de modificación postranslacional en el que se ve implicada fundamentalmente una enzima, la farnesil transferasa (FTasa). Esta unión es crucial para el posterior funcionamiento de las proteínas Ras, por lo que esta segunda aproximación terapéutica está siendo estudiada de manera exhaustiva.

Si se consigue inhibir la acción de dicha enzima las proteínas Ras se mantendrán en el citosol, sin poder interaccionar con sus efectores para desencadenar las señales de crecimiento y diferenciación celular.

En este sentido, diferentes industrias farmacéuticas y numerosos grupos de investigación de todo el mundo⁴² han dirigido sus proyectos a la obtención de inhibidores de FTasa (IFT) capaces de regular y controlar esta enzima. El resultado de sus trabajos es un sinnúmero de fármacos potenciales en diferentes fases clínicas⁴³, descubiertos gracias al diseño racional, en algunos casos, o mediante el cribado de librerías de compuestos, en otros. Los diferentes compuestos se pueden agrupar varios grupos:

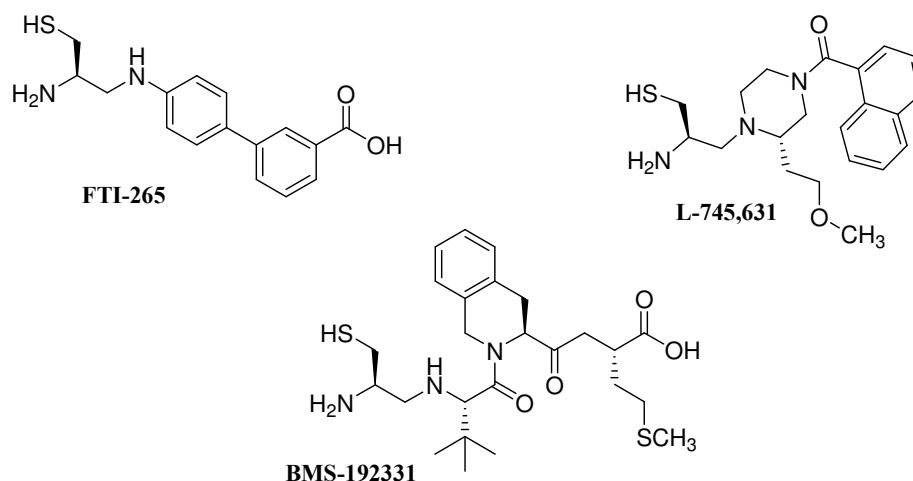
3.2.2.1. Miméticos del extremo C-terminal CAAX

Son aquellos que compiten con la secuencia CAAX de las proteínas p21 Ras e inhiben, por tanto, la unión con la membrana plasmática a través de los grupos farnesilo. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 3.7⁴⁴.

⁴² (a) Ardizzoni, A.; Loprevite, M., *I Supplimenti di Tumori*, **2003**, 2, S17. (b) Ayral-Kaloustian, S.; Salaski, E. J., *Curr. Med. Chem.*, **2002**, 9, 1003.

⁴³ Véase la referencia 42a.

⁴⁴ (a) Wittinghofer, A.; Waldmann, H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2000**, 39, 4192. (b) Williams, T. M., *Exp. Opin. Ther. Patents*, **1999**, 9, 1263. (c) Ayral-Kaloustian, S.; Skotnicki, J., *Annu. Rep. Med. Chem.*, **1996**, 31, 171. (d) Bolton, G. L.; Sebolt-Leopold, J. S.; Hodges, J. C., *Annu. Rep. Med. Chem.*, **1994**, 29, 165.

**Figura 3.7.**

Inhibidores de FTasa que mimetizan el extremo C-terminal de Ras.

FTI-265 inhibe la acción de la FTasa gracias a la presencia y la posición de su grupo carboxilo, corroborando así los estudios de modelización molecular desarrollados para encontrar moléculas no peptídicas capaces de reconocer el sitio de unión de las proteínas Ras con la enzima FTasa⁴⁵. El compuesto L-745,631 y sus derivados, son inhibidores potentes y selectivos de la enzima FTasa *in vivo* y presentan una fuerte actividad antitumoral en H-ras⁴⁶; cabe resaltar que algunos de estos compuestos presentan actividad frente a la malaria⁴⁷. Adicionalmente, se ha descrito una familia de compuestos que contiene un anillo de tetrahydroisoquinolina, BMS-192331, que confiere rigidez y estabilidad metabólica a estos inhibidores. Se ha podido comprobar que pequeñas variaciones estructurales en esta familia

⁴⁵ (a) Qian, Y.; Vogt, A.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D., *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 217. (b) Vogt, A.; Qian, Y.; Blaskovich, M. A.; Fossum, R. D.; Hamilton, A. D.; Sebt, S. M., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 660.

⁴⁶ Leonard, D. M.; Sebolt-Leopold, J. S., *Drugs Fut.*, **1999**, 24, 1099.

⁴⁷ Chakrabarti, D.; Azam, T.; DelVecchio, C.; Qiu, L.; Park, Y. I.; Allen, C. M., *Mol. Biochem. Parasit.*, **1998**, 94, 175.

de tetrahidroisoquinolinas permiten modular la selectividad de los compuestos, pudiéndose conseguir inhibidores de enzimas FTasa o GGTasa (geranilgeranil transferasa)⁴⁸.

3.2.2.2. Análogos de pirofosfato de farnesilo y análogos bisustrato

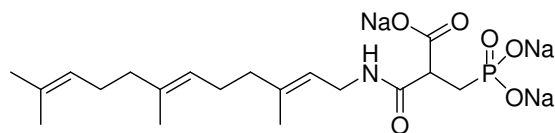
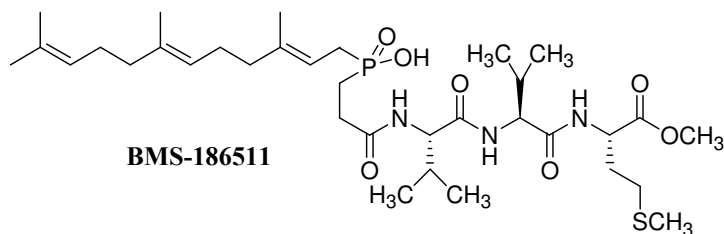
Mediante estudios de rayos X se ha podido observar que la enzima FTasa posee dos centros de unión. El primero de ellos es el que ocupa la secuencia AAX del extremo C-terminal de la proteína Ras, mientras que el segundo es ocupado por pirofosfato de farnesilo (PPF), segundo sustrato de la enzima⁴⁹. Así pues, se han desarrollado, por un lado, compuestos capaces de inhibir la unión del PPF con la enzima FTasa, como por ejemplo los derivados de β -fosfonoalanina no hidrolizables, con excelentes potencias inhibitorias⁵⁰ (Figura 3.8); y por otro, se han buscado también compuestos capaces de mimetizar tanto el extremo C-terminal de las proteínas Ras como el PPF, de manera que actúen como análogos bisustrato de la enzima FTasa, como por ejemplo BMS-186511, de los laboratorios Bristol-Myers Squibb⁵¹ (Figura 3.8).

⁴⁸ (a) Leftheris, K.; Kline, T.; Vite, G. D.; Cho, Y. H.; Bhide, R. S.; Patel, D. V.; Patel, M. M.; Schmidt, R. J.; Weller, H. N.; Andahazy, M. L.; Carboni, J. M.; Gullo-Brown, J. L.; Lee, F. Y.; Rica, C.; Rose, W. C.; Yan, N.; Barbacid, M.; Hunt, J. T.; Meyers, C. A.; Seizinger, B. R.; Zahler, R.; Manne, V., *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 224. (b) Byk, G.; Duchesne, M. J.; Parker, F.; Lelièvre, Y.; Guitton, J. D.; Clerc, F. F.; Becquart, J.; Tocque, B.; Scherman, D., *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 2677. (c) Clerc, F. F.; Guitton, J. D.; Fromage, N.; Lelièvre, Y.; Duchesne, M.; Tocque, B.; James-Surcouf, E.; Commerçon, A.; Bequart, J., *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 1779.

⁴⁹ Long, S. B.; Casey, P. J.; Beese, L. S., *Structure*, **2000**, 8, 209.

⁵⁰ Patel, D. V.; Schmidt, R. J.; Biller, S. A.; Gordon, E. M.; Robinson, S. S.; Manne, V., *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 2906.

⁵¹ (a) Patel, D. V.; Gordon, E. M.; Schmidt, R. J.; Weller, H. N.; Young, M. G.; Zahler, R.; Barbacid, M.; Carboni, J. M.; Gullo-Brown, J. L.; Hunihan, L.; Ricca, C.; Robinson, S.; Seizinger, B. R.; Tuomari, A. V.; Manne, V., *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 435. (b) Manne, V.; Yan, N.; Carboni, J. M.; Tuomari, A. V.; Ricca, C. S.; Brown, J. G.; Andahazy, M. L.; Schmidt, R. J.; Patel, D. V.; Zahler, R.; Weinmann, R.; Der, C. J.; Cox, A. D.; Hunt, J. T.; Gordon, E. M.; Barbacid, M.; Seizinger, B. R., *Oncogene*, **1995**, 10, 1763.

Derivado de β -fosfonoalanina no hidrolizable

BMS-186511

Figura 3.8.

Inhibidores de FTasa análogos de PPF y bisustrato.

3.2.2.3. Productos naturales

Se han descrito algunos compuestos naturales capaces de inhibir la acción de la enzima FTasa, como el antibiótico Manumicina A⁵², capaz de inhibir el crecimiento de una gran variedad de tumores derivados de proteínas Ras mutadas en ratones y de inducir la apoptosis⁵³; el ácido Zaragócico A, descubierto en España, en el río Jalón (Zaragoza), el cual forma parte de una gran familia de inhibidores de FTasa estructuralmente análogos al PPF denominada escualestatinas⁵⁴; algunos esteroides, como la Andrastina C, aislados de cultivos

⁵² (a) Kouchi, H.; Kazufumi, N.; Fushimi, K.; Sakaguchi, M.; Miyazaki, M.; Ohe, T.; Namba, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, 264, 915. (b) Hara, M.; Akasaka, K.; Akinaga, S.; Okabe, M.; Nakano, H.; Gómez, R.; Wood, D.; Uh, M.; Tamanoi, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 2281.

⁵³ Wang, W.; Macaulay, R. J., *Int. J. Cancer*, **1999**, 82, 430.

⁵⁴ (a) Nadin, A.; Nicolau, K. C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 1622. (b) Gibbs, J. B.; Pompliano, D. L.; Mosser, S. D.; Rands, E.; Lingham, R. B.; Singh, S. B.; Scolnick, E. M.; Kohl, N. E.; Oliff, A., *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 7617.

de penicilinas⁵⁵; o derivados de fenoles, como la Preussomerina G⁵⁶, que presenta una selectividad moderada por la enzima FTasa (unas 17 veces mayor) frente a la GGTasa (Figura 3.9).

Sin embargo, de todos los compuestos descubiertos hasta el momento con actividad frente a la enzima FTasa, sólo unos pocos están superando con éxito las diferentes fases clínicas.

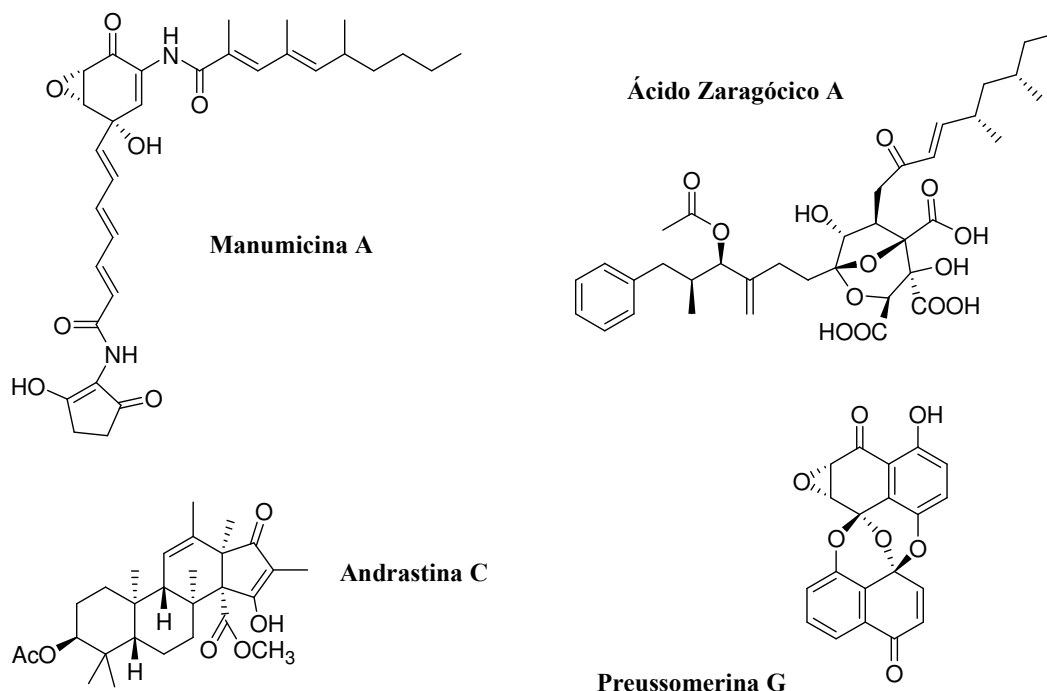


Figura 3.9.

Productos naturales que inhiben la enzima FTasa.

⁵⁵ (a) Omura, S.; Inokoshi, J.; Uchida, R.; Shiomi, K.; Masuma, R.; Kawakubo, T.; Tanaka, H.; Iwai, Y.; Kosemura, S.; Yamamura, S., *J. Antibiot.*, **1996**, *49*, 414. (b) Uchida, R.; Shiomi, K.; Inokoshi, J.; Sunazuka, T.; Tanaka, H.; Iwai, Y.; Takayanagi, H.; Omura, S., *J. Antibiot.*, **1996**, *49*, 418. (c) Uchida, R.; Shiomi, K.; Inokoshi, J.; Tanaka, H.; Iwai, Y.; Omura, S., *J. Antibiot.*, **1996**, *49*, 1278.

⁵⁶ Singh, S. B.; Zink, D. L.; Liesch, J. M.; Ball, R. G.; Goetz, M. A.; Bolessa, E. A.; Giacobbe, R. A.; Silverman, K. C.; Bills, G. F.; Peláez, F.; Cascales, C.; Gibbs, J. B.; Lingham, R. B., *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 6296.

En la actualidad, se empiezan a comercializar fármacos como el Sarasar, de los laboratorios Schering-Plough (Figura 3.10), que ha sido estudiado en diferentes grupos de pacientes con tumores sólidos localizados o metastásicos en estado avanzado, presentando resultados esperanzadores cuando se administra solo⁵⁷ y cuando se mezcla con otros agentes quimioterapéuticos como, por ejemplo, la Gemcitabina⁵⁸.

Otro de los primeros inhibidores de FTasa en ir superando las fases clínicas es el Zarnestra, de Janssen⁵⁹ (Figura 3.10). Hasta el momento se han desarrollado numerosos estudios con este compuesto tanto en solitario⁶⁰ como en compañía de muchos otros agentes citotóxicos como 5-FU/Leucovorin⁶¹, Docetaxel⁶², Irinotecan⁶³, Herceptina⁶⁴, etc.

⁵⁷ (a) Adjei, A. A.; Erlichman, C.; Davis, J. N.; Cutler, D. L.; Sloan, J. A.; Marks, R. S.; Hanson, L. J.; Svingen, P. A.; Atherton, P.; Bishop, W. R.; Kirshmeier, P.; Kaufmann, S. H., *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 1871. (b) Eskens, F. A.; Awada, A.; Cutler, D. L.; de Jonge, M. J.; Luyten, G. P.; Faber, M. N.; Statkevich, P.; Sparreboom, A.; Verweij, J.; Hanauske, A. -R.; Piccart, M., *J. Clin. Oncol.*, **2001**, *19*, 1167. (c) Kim, E. S.; Glisson, B. S.; Meyers, M. L.; Herbst, R. S.; Shin, D. M.; Sttkevich, P.; Bangert, S.; Hong, W. K.; Khuri, F. R., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **2001**, *20*, 785. (d) Khuri, F. R.; Glisson, B. S.; Meyers, M. L.; Herbst, R. S.; Thall, P. F.; Munden, R. F.; Bangert, S.; Cascino, M.; Blumenschein, G.; Pisters, K.; Hong, W. K., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2000**, *19*, Abs. 799.

⁵⁸ (a) Hurwitz, H. I.; Amado, R.; Prager, D.; Hecht, J. R.; Cohen, D. P.; Conway, D.; Kadib, L.; Mayers, A.; Calzetta, A.; Statkevich, P.; Cutler, D. L.; Rosen, L. S., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2000**, *19*, Abs. 717. (b) Lersch, C.; Van Cutsem, E.; Amado, R.; Ehninger, G.; Heike, M.; Kerr, D.; Rothenberg, M. L.; Baum, C. M.; Zaknoen, S. L., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2001**, *20*, Abs. 608.

⁵⁹ Sorbera, L. A.; Fernández, R.; Castañer, J., *Drugs of the Future*, **2001**, *26*, 453.

⁶⁰ (a) Zujewski, J.; Horak, I. D.; Bol, C. J.; Woestenborghs, R.; Bowden, C.; End, D. W.; Piotrovsky, V. K.; Chiao, J.; Belly, R. T.; Todd, A.; Kopp, W. C.; Kohler, D. R.; Chow, C.; Noone, M.; Hakim, F. T.; Larkin, G.; Gress, R. E.; Naussenblatt, R. B.; Kremer, A. B.; Cowan, K. H., *J. Clin. Oncol.*, **2000**, *18*, 927. (b) Pund, C. J.; van Maanen, L.; Bol, C. J.; Seifert, W. F.; Wagener, D. J., *Anti-Cancer Drugs*, **2001**, *12*, 193. (c) Nakagawa, K.; Yamamoto, N.; Nishio, K.; Ohashi, Y.; End, D.; Bol, K.; Ito, H.; Fukuoka, M., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2001**, *20*, Abs. 317.

⁶¹ Verslype, C.; Van Steenbergen, W.; Humblet, Y.; Marse, H.; De Vis, J.; Palmer, P.; Seifert, W.; Bol, C.; Van Cutsem, E., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2001**, *20*, Abs. 681.

⁶² Piccart-Gebhart, M. J.; Branle, F.; de Valeriola, D.; Dubuisson, M.; Hennebert, P.; Gil, T.; Forget, F.; Seifert, W. F.; Thibault, A.; Bol, C. J.; Awada, A., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2001**, *20*, Abs. 318.

⁶³ Verweij, J.; Kheir, D. F. S.; Planting, A. S. T.; de Jonge, M. J. A.; Eskens, F.; Klaren, A.; De Heus, G.; Palmer, P. A.; Bol, C. J.; Sparreboom, A., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2001**, *20*, Abs. 319.

⁶⁴ Schwartz, G.; Rowinsky, E. K.; Rha, S. Y.; Hammond, L. A.; Smith, L.; Patnaik, A.; Hidalgo, M.; Berg, K.; Izbic, E., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2001**, *20*, Abs. 322.

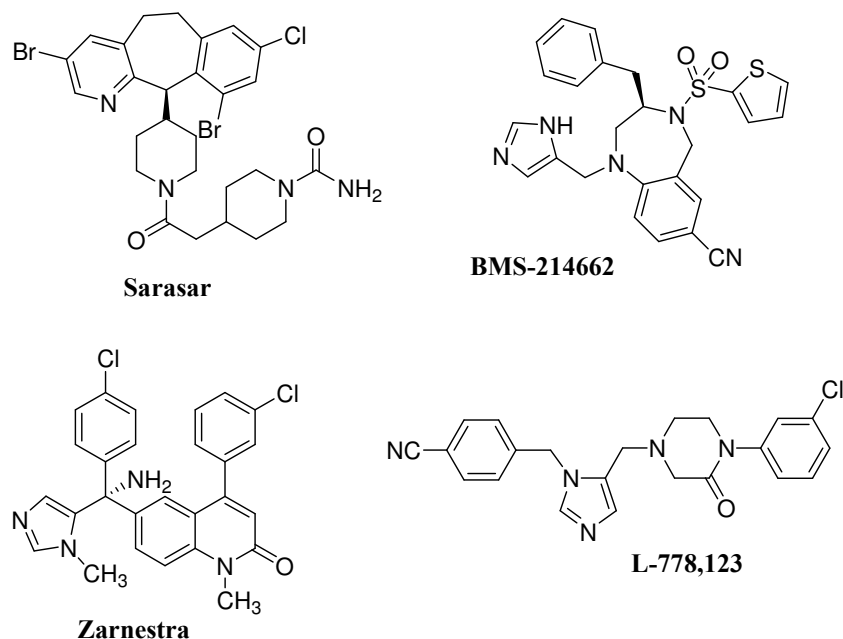


Figura 3.10.

Inhibidores de FTasa en fases clínicas avanzadas.

Los laboratorios Bristol-Myers Squibb y Merck también están tomando buenas posiciones en la carrera de aprobación de fármacos capaces de inhibir los procesos tumorales desencadenados por las proteínas Ras mutadas con sus compuestos BMS-214662 y L-778, 123, respectivamente (Figura 3.10)⁶⁵.

La importancia de los IFT radica en su elevada selectividad y baja toxicidad, lo que supone todo un avance en el tratamiento de los tumores humanos provocados por mutaciones en Ras⁶⁶.

⁶⁵ Véase la referencia 42b.

⁶⁶ (a) Dalton, M. B.; Fantle, K. S.; Bechtold, H. A.; DeMaio, L.; Evans, R. M.; Krystosek, A.; Sinensky, M., *Cancer Res.*, **1995**, 55, 3295. (b) Lebowitz, P. F.; Prendergast, G. C., *Oncogene*, **1998**, 17, 1439. (c) Rak, J.; Mitsuhashi, Y.; Bayko, L.; Filmus, J.; Shirasawa, S.; Sasazuki, T.; Kerbel, R. S., *Cancer Res.*, **1995**, 55, 4575.

A pesar de que estos compuestos no sólo controlan el crecimiento tumoral por inhibición directa de la proliferación, sino que además actúan favorablemente frente a la angiogénesis⁶⁷, la apoptosis⁶⁸, la formación de husos mitóticos⁶⁹, etc.; no producen resultados tan espectaculares como los esperados en un principio para pacientes humanos. Mientras que H-Ras se modifica exclusivamente por acción de la FTasa, K- y N-Ras pueden adoptar el cambio postranslacional por acción única de la GGTasa. Los tratamientos desarrollados a base de inhibidores de ambas enzimas están resultando ser poco tolerados, debido a su elevada toxicidad⁷⁰.

3.2.3. Inhibición de la unión de Ras con sus distintos efectores

De todas las enzimas efectoras de las proteínas Ras cabe destacar la proteína quinasa de serina / treonina Raf, la primera en ser caracterizada y la mejor estudiada hasta el momento. Raf es capaz de activar la transcripción a través de fosforilaciones / desfosforilaciones en la cascada de quinasas MEK / MAPK.

La búsqueda de inhibidores de la ruta Ras / Raf / MEK / ERK es de gran interés, debido a que esta cascada celular aparece activa, de manera constante, en un gran número de procesos

⁶⁷ (a) Kranenburg, O.; Gebbink, M. F. B. G.; Voest, E. E., *Biochem. Biophys. Acta*, **2004**, 1654, 23. (b) Feldkamp, M. M.; Lau, N.; Rak, J.; Kerbel, R. S.; Guha, A., *Int. J. Cancer*, **1999**, 81, 118. (c) Véanse las referencias 66b y 66c.

⁶⁸ (a) Barrington, R. E.; Subler, M. A.; Rands, E.; Omer, C. A.; Miller, P. J.; Hundley, J. E.; Koester, S. K.; Troyer, D. A.; Bearss, D. J.; Conner, M. W.; Gibbs, J. B.; Hamilton, K.; Koblen, K. S.; Mosser, S. D.; O'Neill, T. J.; Schaber, M.D.; Senderak, E. T.; Windle, J. J.; Oliff, A.; Kohl, N. E., *Mol. Cell. Biol.*, **1998**, 18, 85. (b) Song, S. Y.; Meszoely, I. M.; Coffey, R. J.; Pietenpol, J. A.; Leach, S. D., *Neoplasia*, **2000**, 2, 261.

⁶⁹ (a) Ashar, H. R.; James, L.; Gray, K.; Carr, D.; Black, S.; Armstrong, L.; Bishop, W. R.; Kirschmeier, P., *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 30451. (b) Ashar, H. R.; Armstrong, L.; James, L. J.; Carr, D. M.; Gray, K.; Taveras, A.; Doll, R. J.; Bishop, W. R.; Kirschmeier, P. T., *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, 13, 949. (c) Crespo, N. C.; Ohkanda, J.; Yen, T. J.; Hamilton, A. D.; Sebt, S. M., *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 16161.

⁷⁰ (a) Véase la referencia 11c. (b) Lobell, R. B.; Omer, C. A.; Abrams, M. T.; Bhimnathawala, H. G.; Brucker, M. J.; Buser, C. A.; Davide, J. P.; deSolms, S. J.; Dinsmore, C. J.; Ellis-Hutchings, M. S.; Kral, A. M.; Liu, D.; Lumma, W. C.; Machotka, S. V.; Rands, E.; Williams, T. M.; Graham, S. L.; Hartman, G. D.; Oliff, A. I.; Heimbrook, D. C.; Kohl, N. E., *Cancer Res.*, **2002**, 61, 8758.

tumorales⁷¹, como por ejemplo en un 66 %, aproximadamente, de los melanomas humanos⁷².

Hasta el momento sólo se conocen compuestos capaces de inhibir Raf y MEK. Los inhibidores de Raf pueden actuar siguiendo mecanismos de actuación muy diferentes. Existen compuestos que inhiben la actividad de las proteínas Raf uniéndose a su dominio quinasa, como por ejemplo BAY 43-9006 (Figura 3.11); mientras que otros inhiben la dimerización de Raf, esencial para su actividad, como la Geldanamicina (Figura 3.11)⁷³.

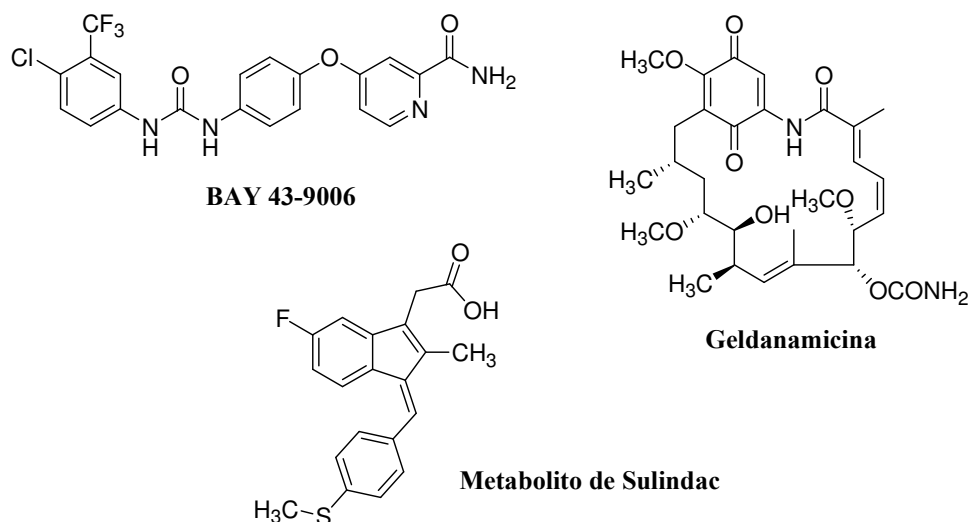


Figura 3.11.

Inhibidores de la proteína Raf.

⁷¹ Levitzki, A., *Acc. Chem. Res.*, **2003**, 36, 462.

⁷² Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B. A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J. W.; Leung, S. Y.; Yuen, S. T.; Weber, B. L.; Seigler, H. F.; Darrow, T. L.; Paterson, H.; Marais, R.; Marshall, C. J.; Wooster, R.; Stratton, M. R.; Futreal, P. A., *Nature*, **2002**, 417, 949.

⁷³ (a) Lyons, J. F.; Wilhelm, S.; Hibner, B.; Bollag, G., *Endocr. Relat. Cancer*, **2001**, 8, 219. (b) Stancato, L. F.; Chow, Y. H.; Hutchison, K. A.; Pordew, G. H.; Jove, R.; Pratt, W. B., *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 21711.

En la Figura anterior (Figura 3.11), también se ha representado el metabolito del antiinflamatorio Sulindac, recientemente descubierto, el cual es capaz de inhibir las interacciones proteína-proteína entre Ras y su efector Raf⁷⁴.

Inhibidores específicos de MEK⁷⁵ son, por ejemplo, PD98059 y UO126 o PD184352, inhibidor de segunda generación, con el cual se han realizado ya numerosos estudios en pacientes con carcinoma de colon⁷⁶ (Figura 3.12).

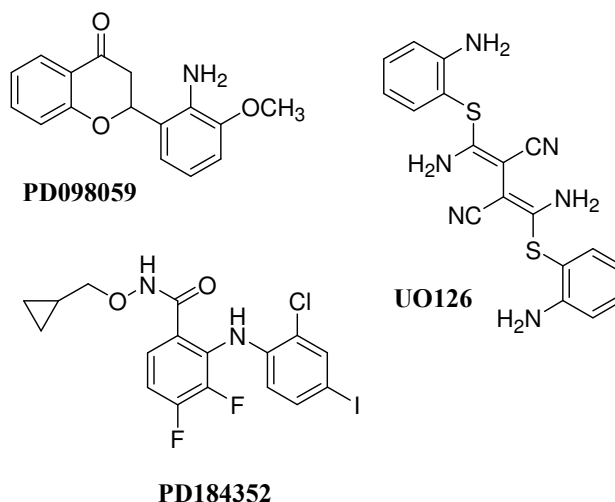


Figura 3.12.

Inhibidores específicos de la proteína quinasa MEK.

Por otro lado, también se están investigando los inhibidores de la quinasa efectora de Ras PI(3)K. Esta molécula es capaz de controlar la actividad de un elevado número de enzimas que actúan en la cascada celular posterior a la activación de Ras como, por ejemplo, PDK1 (*phosphoinositide 3-kinase dependant kinase 1*) y Akt (también conocida como PKB, familia

⁷⁴ Müller, O.; Gourzoulidou, E.; Carpintero, M.; Karaguni, I-M.; Langerak, A.; Herrmann, C.; Mörröy, T.; Klein-Hitpaß, L.; Waldmann, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 450.

⁷⁵ Chang, F.; Steelman, L. S.; Lee, J. T.; Shelton, J. G.; Navolanic, P. M.; Blalock, W. L.; Franklin, R. A.; McCubrey, J. A., *Leukemia*, **2003**, *17*, 1263.

⁷⁶ Sebolt-Leopold, J. S.; Dudley, D. T.; Herrera, R.; Van Becelaere, K.; Wiland, A.; Gowan, R. C.; Tecle, H.; Barrett, S. D.; Bridges, A.; Przybranowski, S.; Leopold, W. R.; Saltiel, A. R., *Nat. Med.*, **1999**, *5*, 810.

de proteínas quinasa de serina / treonina con un dominio de homología de pleckstrina)⁷⁷. Además, PI(3)K también puede activar otros efectores de Ras como Rac y Rho. Entre los inhibidores de la cascada de PI(3)K conocidos hasta la fecha se encuentran análogos de la Rampamicina como CCI-779 (de Wyeth-Ayerst) y RAD001 (de Novartis)⁷⁸.

Cada día se conocen más datos estructurales acerca de la interacción de Ras con sus efectores y hoy en día se puede disponer de estructuras de alta resolución de los complejos de Ras con Raf, Ral, PI(3)K y RalGDS, lo cual permite empezar a diseñar y desarrollar fármacos capaces de inhibir interacciones proteína-proteína, como se ha podido ver para el caso de Ras / Raf.

3.2.4. Inhibición de las proteínas quinasa de la ruta anterior a Ras

En algunos casos se ha podido comprobar que la proliferación, la diferenciación celular y la prevención de la apoptosis están reguladas directamente a través la asociación de citoquinas, hormonas polipeptídicas, eritropoetinas... *etc*, reguladas por la fosforilación / desfosforilación de proteínas tirosina quinasa (PTK)⁷⁹. Estas proteínas, relacionadas con el desarrollo del cáncer y con la activación directa de Sos y Ras, están consideradas como una de las dianas terapéuticas de mayor interés en la actualidad⁸⁰.

De todas las proteínas tirosina quinasa que actúan en la activación de Ras, las tirosinas quinasa de los receptores de factores de crecimiento⁸¹ son las que presentan, hoy en día, más posibilidades terapéuticas. De manera particular, EGFR y ERBB2 (HER2) son capaces de activar Ras a través de sus moléculas adaptadoras Grb2 y Sos. Actualmente, al menos seis inhibidores de la actividad tirosina quinasa de EGFR se encuentran en fase clínica. Estos compuestos pueden, a la vez, inhibir otros receptores de factores de crecimiento como el ya mencionado ERBB2. Los dos fármacos que se encuentran en estados más avanzados en los

⁷⁷ Khwaja, A.; Rodríguez-Viciano, P.; Wennstrom, S.; Warne, P. H.; Downward, J., *EMBO J.*, **1997**, *16*, 2783.

⁷⁸ (a) Véase la referencia 11c. (b) Geoerger, B.; Kerr, K.; Tang, C-B.; Fong, K-M.; Powell, B.; Sutton, L. N.; Phillips, P. C.; Janss, A. J., *Cancer Res*, **2001**, *61*, 1527.

⁷⁹ Véase la referencia 75.

⁸⁰ Levitzki, A., *Pharmacol. Ther.*, **1999**, *82*, 231.

⁸¹ Yaish, P.; Gazit, A.; Gilon, C.; Levitzki, A., *Science*, **1988**, *242*, 933.

ensayos clínicos son Iressa⁸², de AstraZeneca, y Tarceva⁸³, de OSI/Genentech (Figura 3.13); ambos compuestos presentan propiedades farmacológicas similares.

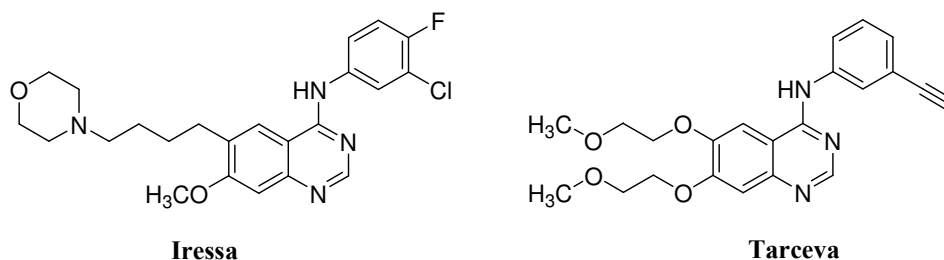


Figura 3.13.

Inhibidores de los receptores de factores de crecimiento EGFR.

Otros compuestos inhibidores⁸⁴ de las proteínas tirosina quinasa EGFR en fase clínica son PKI116, de Novartis, GW2016, de GlaxoSmithKline, EKB-569, de Genetics Institute / Wyeth-Ayerts, y CI-1033, de Pfizer.

3.2.5. Otras aproximaciones terapéuticas

Una aproximación terapéutica de enorme actualidad es la inmunoterapia génica, basada en anticuerpos monoclonales y oligonucleótidos antisentido.

Los anticuerpos monoclonales se pueden unir al dominio extracelular de los receptores de los factores de crecimiento, inhibiendo así su activación, o pueden actuar induciendo una respuesta inmune citotóxica contra las células tumorales⁸⁵. Dos de los fármacos de este tipo en estado más avanzado son los anticuerpos monoclonales Cetuximab / Erbitux, desarrollado

⁸² Herbst, R. S., *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2002**, *11*, 837.

⁸³ Hidalgo, M.; Siu, L. L.; Nemunaitis, J.; Rizzo, J.; Hammond, L. A.; Takimoto, C.; Eckhardt, S. G.; Tolcher, A.; Britten, C. D.; Denis, L.; Ferrante, K.; Von Hoff, D. D.; Silberman, S.; Rowinsky, E. K., *J. Clin. Oncol.*, **2001**, *19*, 3267.

⁸⁴ Véase la referencia 11c.

⁸⁵ Herbst, R. S.; Shin, D. M., *Cancer*, **2002**, *94*, 1593.

por Merck-ImClone Systems, capaz de inhibir EGFR⁸⁶, y Herceptina, de Genentech, inhibidor de ERBB2 (HER2)⁸⁷.

Por otra parte, los nucleótidos antisentido son oligonucleótidos sintéticos específicos para secuencias de mRNA (ARN mensajero) de una determinada proteína, como Ras o Raf, que actúan inhibiendo la producción de la misma⁸⁸. En este sentido, Isis Pharmaceuticals ha desarrollado⁸⁹ varias secuencias estabilizadas de derivados de oligonucleótidos, como ISIS2503 e ISIS5132, capaces de reducir la expresión de H-Ras y c-Raf1, respectivamente.

Asimismo, cabe destacar, de entre los numerosos compuestos con importante actividad citotóxica descritos hasta la fecha, la familia de carboxamido-amino-imidazoles, genéricamente denominada CAIs, a la cual pertenece el compuesto **L-651,582**, de los laboratorios Merck, que posee una elevada capacidad para inhibir la acción de receptores enzimáticos⁹⁰ implicados en el desarrollo de tumores relacionados con alteraciones en Ras (Figura 3.14). Este compuesto ha sido empleado como control positivo de los ensayos biológicos realizados a lo largo de esta Tesis Doctoral.

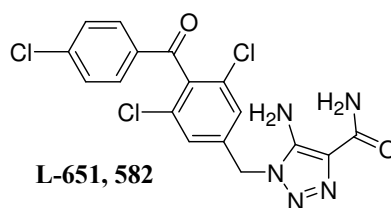
⁸⁶ (a) Blackledge, G.; Averbuch, S., *British J. Cancer*, **2004**, *90*, 566. (b) Robert, F.; Ezekiel, M. P.; Spencer, S. A.; Meredith, R. F.; Bonner, J. A.; Khazaeli, M. B.; Sale, M. N.; Carey, D.; LoBuglio, A. F.; Wheeler, R. H.; Cooper, M. R.; Waksal, H. W., *J. Clin. Oncol.*, **2001**, *19*, 3234.

⁸⁷ Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L., *N. Engl. J. Med.*, **2001**, *344*, 783.

⁸⁸ Crooke, S. T., *Oncogene*, **2000**, *19*, 6651.

⁸⁹ (a) Chen, G.; Oh, S.; Monia, B. P.; Stacey, D. W., *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 28259. (b) Monia, B. P.; Johnston, J. F.; Geiger, T.; Muller, M.; Fabbro, D., *Nature Med.*, **1996**, *2*, 668.

⁹⁰ Kohn, E. C.; Liotta, L. A., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1990**, *82*, 54.

**Figura 3.14.**

Compuesto de referencia para las pruebas biológicas.

En la Tabla 3.1 se recogen, a modo de resumen de este amplio apartado, las aproximaciones terapéuticas más estudiadas hasta el momento en la vía de señalización Ras junto con unas breves notas, como los fármacos más significativos de cada una de ellas y la fase clínica en la que se encuentran a día de hoy.

Tabla 3.1. Resumen de los compuestos con actividad citotóxica en la vía de señalización Ras⁹¹.

Objetivo	Fármaco	Tipo	Fase clínica
Ras (IFT)	Zarnestra	Peptidomimético de CAAX	III
	Sarasar	Peptidomimético de CAAX	II
	L-778,123	Peptidomimético de CAAX	II
	BMS-214662	Peptidomimético de CAAX	I
H-Ras, mARN	ISIS2503	Oligonucleótido antisentido	II
c-Raf1, mARN	ISIS5132	Oligonucleótido antisentido	II
MEK	PD184352	Inhibidor de quinasas	I
Raf	BAY 43-9006	Inhibidor de quinasas	I
EGFR	Iressa	Inhibidor de quinasas	III
	Tarceva	Inhibidor de quinasas	III
	Cetuximab	Anticuerpo monoclonal	II
ERBB2	Herceptina	Anticuerpo monoclonal	III

⁹¹ Véase la referencia 11c.

3.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS p21 RAS

Gracias a los grandes avances en las técnicas de determinación estructural se ha podido conocer la estructura de una gran multitud de proteínas, tanto en estado libre como asociado a sus sustratos, cofactores, ADN o a otras proteínas.

Los parámetros estructurales disponibles en bases de datos como la base de datos estructural de Cambridge (*Cambridge Structural Database*)⁹² o el banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank, PDB*)⁹³ han contribuido decisivamente al conocimiento de la función biológica de las proteínas. En particular, los datos de la estructura tridimensional, junto con los estudios de mutagénesis, son un buen punto de partida para el análisis detallado del mecanismo de acción, ya que facilitan la identificación de aminoácidos con una función específica. Por otra parte, la configuración espacial de los complejos proteína-sustrato es la base para el diseño racional de fármacos.

Entre las técnicas fundamentales de determinación estructural de biomoléculas destacan la difracción de rayos X⁹⁴ y la resonancia magnética nuclear (RMN)⁹⁵; ambas técnicas proporcionan información complementaria.

El análisis por rayos X exige la preparación de una muestra cristalina, a partir de la cual se obtienen datos de difracción y se calcula el mapa de densidad electrónica del cristal, sobre el que se introducen los aminoácidos correspondientes y se construye el modelo de proteína adecuado.

⁹² (a) Allen, F. H.; Bellard, S.; Brice, M. D.; Cartwright, B. A.; Doubleday, A.; Higgs, H.; Hummelink, T.; Hummelink-Peters, B. G.; Kennard, O.; Motherwell, W. D. S.; Rodgers, J. R.; Watson, D. G., *Acta Cryst.*, **1979**, B35, 2331. (b) Allen, F. H.; Davies, J. E.; Galloy, J. J.; Johnson, O.; Kennard, O.; Macrae, C. F.; Mitchell, E. M.; Mitchell, G. F.; Smith, J. M.; Watson, D. G., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1991**, 31, 187. (c) Maginn, S. J., *Scient. Data Manag.*, **1999**, 3, 24.

⁹³ (a) Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J. B.; Mayer, G. F.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasami, M., *J. Mol. Biol.*, **1977**, 112, 535. (b) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E., *Nucl. Acids Res.*, **2000**, 28, 235. <http://www.rcsb.org/pdb/>

⁹⁴ (a) Allen, F. H., *Acta Cryst.*, **1998**, A54, 758. (b) Abola, E.; Kuhn, P.; Earnest, T.; Stevens, R. C., *Nat. Struct. Biol. Suppl.*, **2000**, 973. (c) Stevens, R. C., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2000**, 10, 558.

⁹⁵ Ernst, R. R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A., *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Oxford University Press, Londres, **1987**.

La RMN tiene su mérito propio en muchos otros campos de la química y es un método esencial para la elucidación de macroestructuras biológicas⁹⁶. Actualmente se está desarrollando una base de datos denominada *e-NMR guide*⁹⁷, en la que se puede encontrar información exhaustiva sobre los distintos experimentos de RMN.

Mientras que los rayos X sólo permiten obtener una conformación en estado cristalino, la RMN permite adquirir espectros de las proteínas en su medio natural, en disolución acuosa, de manera que se obtienen a un tiempo las diferentes conformaciones en el equilibrio. Sin embargo, una limitación de la RMN es el tamaño de las proteínas; hoy por hoy es posible determinar proteínas de hasta 25 KDa, aunque empiezan a poder rebasarse estos límites gracias al desarrollo de nuevos experimentos cada vez más sofisticados.

La determinación estructural de proteínas mediante secuencias de pulsos y experimentos bidimensionales puede exigir el marcaje isotópico de las proteínas con ¹⁵N y ¹³C, núcleos activos en RMN, siendo para ello necesario enriquecer los cultivos celulares en los que se expresan las proteínas con ¹⁵NH₄Cl y glucosa-¹³C⁹⁸. Actualmente, el cuello de botella de estas técnicas sigue siendo la asignación de cada pico de un espectro a su correspondiente aminoácido.

A pesar de las posibles limitaciones, la RMN es una técnica muy útil para obtener información sobre la estructura de los complejos ligando-proteína a través de los experimentos NOESY⁹⁹, que permiten identificar aminoácidos próximos en el espacio, aunque a veces muy alejados en la estructura primaria de las proteínas. Por otro lado, las medidas de las constantes de acoplamiento¹⁰⁰ también son de gran importancia en los estudios de RMN, ya que dan información acerca de los ángulos torsionales de las biomoléculas.

⁹⁶ (a) Meyer, B.; Peters, T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 864. (b) Salvatella, X.; Giralt, E., *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, 32, 365. (c) Pellecchia, M.; Sem, D. S.; Wüthrich, K., *Nature Rev.*, **2002**, 1, 212. (d) Ishima, R.; Torchia, D. A., *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, 7, 740. (e) Moore, J. M., *Biopol.*, **1999**, 51, 221.

⁹⁷ Guía electrónica de resonancia, e-NMR-guide: <http://www.bruker.de/guide/>

⁹⁸ Clore, G. M.; Gronenborn, A. M., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, 2, 564.

⁹⁹ Neuhaus, D.; Williamson, M. P., *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. VCH Publisher, NY, **1989**.

¹⁰⁰ Tjandra, N.; Bax, A., *Science*, **1997**, 278, 1111.

Gracias al estudio combinado de estas dos técnicas se ha podido determinar, entre otras muchas, la estructura tridimensional de las proteínas pertenecientes a la familia Ras unidas a GTP, GDP o incluso a alguno de sus efectores^{101, 102}.

Las proteínas Ras constan de cuatro dominios característicos que apenas varían de una especie a otra¹⁰³. En cuanto a la estructura primaria, empezando por el extremo amino terminal se observan ochenta y cinco aminoácidos que son idénticos tanto en H- y K- como en N-Ras. A continuación se encuentra una zona de conservación menor (70–80 %), que contiene unos ochenta aminoácidos; seguida de la región hipervariable, en la que se encuentran los residuos restantes (Figura 3.15). Los cuatro últimos aminoácidos, los del extremo carboxi-terminal (C-terminal), son siempre CAAX (cisteína – dos residuos alifáticos – aminoácido neutro). Estos cuatro residuos son, como se ha visto en los apartados anteriores, de gran importancia para el correcto funcionamiento de las proteínas Ras, ya que permiten el anclaje a la membrana celular a través de los grupos farnesilo o palmitoilo y, por consiguiente, el acercamiento a todos los receptores, efectores y demás moléculas que intervienen en el proceso de activación de la señalización vía Ras¹⁰⁴.

¹⁰¹ (a) Ito, Y.; Yamasaki, K.; Iwahara, J.; Terada, T.; Kamiya, A.; Shirouzu, M.; Muto, Y.; Kawai, G.; Yokoyama, S.; Laue, E. D.; Wälchli, M.; Shibata, T.; Nishimura, S.; Miyazawa, T., *Biochemistry*, **1997**, *36*, 9109. (b) Kraulis, P. J.; Domaille, P. J.; Campbell-Burk, S. L.; Van Aken, T.; Laue, E. D., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 3515. (c) Stumber, M.; Geyer, M.; Graf, R.; Kalbitzer, H. R.; Scheffzek, K.; Haeblerlen, U., *J. Mol. Biol.*, **2002**, *323*, 899.

¹⁰² (a) Schlichting, I.; John, J.; Frech, M.; Charding, P.; Wittinghofer, A.; Zimmermann, H.; Roesch, P., *Biochemistry*, **1990**, *29*, 504. (b) Pai, E. F.; Kabsch, W.; Krengel, U.; Holmes, K. C.; John, J.; Wittinghofer, A., *Nature*, **1989**, *341*, 209. (c) Pai, E. F.; Krengel, U.; Petsko, G. A.; Goody, R. S.; Kabsch, W.; Wittinghofer, A., *EMBO J.*, **1990**, *9*, 2351. (d) Milburn, M. V.; Tong, L.; DeVos, A. M.; Brünger, A.; Yamaizumi, Z.; Nishimura, S.; Kim, S-H., *Science*, **1990**, *247*, 939.

¹⁰³ Véase la referencia 4.

¹⁰⁴ (a) Chen, Z. Q.; Ulsh, L. S.; DuBois, G.; Shih, T. Y., *J. Virol.*, **1985**, *56*, 607. (b) Buss, J. E.; Sefton, B. M., *Mol. Cell Biol.*, **1986**, *6*, 116. (d) Véase la referencia 11c.

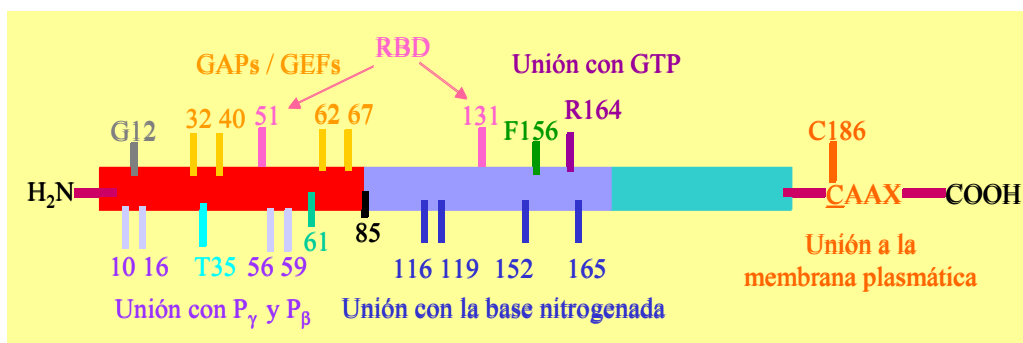


Figura 3.15.

Residuos más significativos de las proteínas p21 Ras. RBD significa dominio de unión de Ras (*Ras Binding Domain*).

El dominio catalítico de Ras lo constituyen los aminoácidos 1-171. Los residuos de las posiciones 10-16 y 56-59 son los responsables de la unión a los nucleótidos de guanina (GDP o GTP), debido a su interacción con los dos grupos fosfato terminales (P_γ y P_β) y los que se encuentran en las posiciones 116-119 y 152-165 son claves en la interacción con la base nitrogenada¹⁰⁵; mientras que los aminoácidos 32-40 y 62-67, que constituyen la denominada región efectora, son esenciales para la señalización desde Ras a sus efectores. Por comparación de las estructuras cristalinas de Ras-GDP y Ras-GTP se ha determinado que el paso de la forma activa a la inactiva está relacionado con un cambio conformacional asociado a dos regiones, la denominada *Switch I*, residuos 30-38, que solapa con la región efectora y la *Switch II* - aminoácidos 60-76-, necesarias para el intercambio de GDP por GTP¹⁰⁶ y para la unión a los reguladores GAPs¹⁰⁷ y GEFs¹⁰⁸, respectivamente. Por otro lado, los aminoácidos 51 a 131 son los responsables de la unión de Ras con Raf, dominio conocido

¹⁰⁵ Véase la referencia 16.

¹⁰⁶ Véase la referencia 102d.

¹⁰⁷ Véase la referencia 21.

¹⁰⁸ Muegge, I.; Schweins, T.; Langen, R.; Warshel, A., *Structure*, **1996**, 4, 475.

como RBD (*Ras binding domain*)¹⁰⁹. Esta secuencia de aminoácidos se organiza en cinco hélices α y seis hebras β , y contiene segmentos de giro (*loops*) de tipo giro β (Figura 3.16).

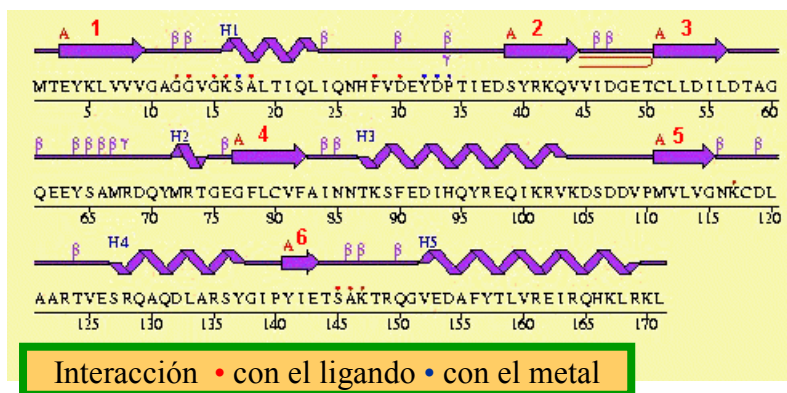


Figura 3.16.

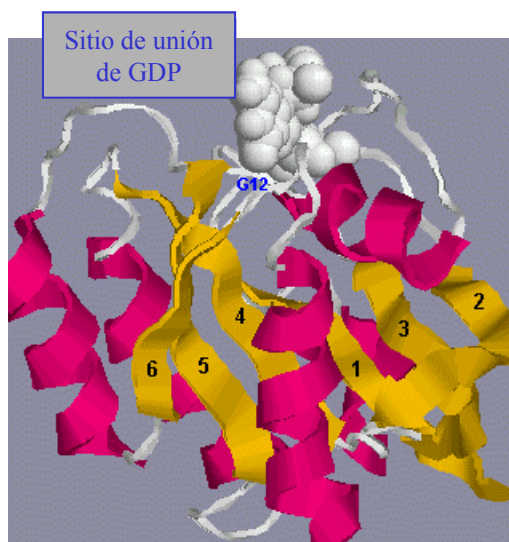
Estructuras primaria y secundaria de la proteína Ras.

La estructura terciaria de Ras (Figura 3.17) está definida por una capa α - β - α , en la que la lámina de las seis hebras β está empaquetada entre las dos capas de hélices α . Las dos superficies de la lámina son hidrofóbicas. Las hebras β se unen entre sí mediante enlaces de hidrógeno, formando una lámina β mixta paralela que, debido a su hidrofobicidad, necesita interactuar con hélices anfífilas que faciliten su contacto con el medio. Los giros que se encuentran en las proximidades del extremo C-terminal de la lámina forman el sitio activo, en el que se unen, de manera específica, los nucleótidos de guanina¹¹⁰.

El cambio de un solo aminoácido puede desestabilizar la estructura primaria, secundaria y sobre todo la estructura terciaria de la proteína, y desencadenar todo un proceso tumoral. De manera especial, mutaciones aisladas en los codones 12, 13, 59, 63, 116 y 119 de los proto-oncogenes ras son capaces de desencadenar alteraciones en la transducción de las señales mitogénicas.

¹⁰⁹ Wittinghofer, A.; Nassar, N., *TIBS*, **1996**, 21, 488.

¹¹⁰ (a) PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/9aa1/>. (b) Véase la referencia 101a.

**Figura 3.17.**

Estructura terciaria de Ras.

La primera mutación descrita fue la del codón 12, donde un cambio de una base púrica, la guanina (**G**G**C**), por otra pirimidínica, la timina (**G**T**C**), hace que en la proteína Ras mutada se introduzca una valina en posición 12 en vez de una glicina. El cambio de la G12 por cualquier otro aminoácido, a excepción de prolina, hace que las proteínas Ras dejen de funcionar correctamente¹¹¹. El cambio de la G13, situada justo a continuación, también da lugar a transformaciones importantes en las proteínas Ras. Cuando se sustituye G13 por V13 o D13, estas transformaciones desencadenan procesos tumorales¹¹².

De la misma manera, otra mutación importante es la que ocurre en el codón 61. Cualquier cambio de la Q61 por otro aminoácido distinto de P61, E61 o G61, también desencadena procesos tumorales. La Q61 junto con la T35 participa en la estabilización del estado de

¹¹¹ Seeburg, P. H.; Colby, W. W.; Capon, D. J.; Goeddel, D. V.; Levinson, A. D., *Nature*, **1984**, 312, 71.

¹¹² (a) Bos, J. L.; Toksoz, D.; Marshall, C. J.; Verlaan-de Vries, M.; Veeneman, G. H.; van der Eb, A. J.; van Boom, J. H.; Janssen, J. W.; Steenvoorden A. C., *Nature*, **1985**, 315, 726. (b) Véase la referencia 109.

transición durante la hidrólisis de GTP, estabilizando la carga del fosfato liberado¹¹³. La T35 participa también en distintos enlaces de hidrógeno con el γ -fosfato y con el magnesio (Mg^{2+}) y forma parte de la región conocida como *Switch I* - residuos 30-38-¹¹⁴.

Estas tres posiciones, la G12, la Q61 y la T35, son claves para la actividad GTPasa de las proteínas p21 Ras¹¹⁵.

Gracias a los numerosos estudios estructurales hoy en día se conocen con exactitud las posiciones y funciones características de todos los aminoácidos que constituyen las proteínas p21 Ras. Cambios en cualquiera de los residuos de elevada conservación hacen que puedan iniciarse procesos neoplásicos. En la Tabla 3.2 están esquematizados todos los aminoácidos importantes agrupados en dos grandes bloques, el cluster 1 (residuos 5 a 91) y el cluster 2 (del aminoácido 92 al 194). Se indica también en esta Tabla qué aminoácidos forman parte de cada hélice α o β y de cada giro (L)¹¹⁶.

Tabla 3.2. Residuos que se mantienen en la estructura de Ras. G1-3 representan los sitios de unión del nucleótido de guanina; mientras que PM1-3 los de unión a magnesio (Mg^{2+}) y fosfato.

Cluster C1: β1 (V8, V9), L1 (V14, G15), α1 (K16, L19, L23), L2 (T35), β2 (D38), β3 (L53, I55, D57, T58), L4 (A59, G60), L10 (A 146), α5 (V152, F156).	
V8, V9	Fijan la posición de K16, que contacta el nucleótido de guanina.
V14	Contacta con el cluster 2.
G15	Parte del sitio de unión de Mg/fosfato PM1.
K16	Varios contactos: β 1 (V8, V9), β 3 (D56, T58), L1 (V14), L4 (G60) y parte del sitio de unión PM1.
L19, L23	Contacto con α 5 (V152, F156, L19) y con el cluster 2 (N116).
T35	Sitio de unión de PM2
D38	Es el único residuo conservado en la β 2. Residuo muy expuesto.

¹¹³ Goody, R. S.; Pai, E. F.; Schlichting, I.; Rensland, H.; Scheidig, A.; Franken, S.; Wittinghofer, A., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **1992**, *Series B: Biological Sciences*, 336, 3.

¹¹⁴ Véase la referencia 16.

¹¹⁵ (a) Tabin, C. J.; Bradley, S. M.; Bargmann, C. I.; Weinberg, R. A.; Papageorge, A. G.; Scolnick, E. M.; Dhar, R.; Lowy, D. R.; Chang, E. H., *Nature*, **1982**, 300, 143. (b) Reddy, E. P.; Reynolds, R. K.; Santos, E.; Barbacid, M., *Nature*, **1982**, 300, 149. (c) Taparowsky, E.; Suard, Y.; Fasano, O.; Shimizu, K.; Goldfarb, M.; Wigler, M., *Nature*, **1982**, 300, 762.

¹¹⁶ Valencia, A.; Chardin, P.; Wittinghofer, A.; Sander, C., *Biochem.*, **1991**, 30, 4637.

Tabla 3.2, continuación. Residuos que se mantienen en la estructura de Ras. G1-3 representan los sitios de unión del nucleótido de guanina; mientras que PM1-3 los de unión a magnesio (Mg^{2+}) y fosfato.

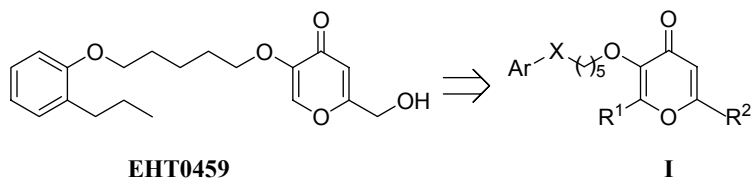
I55	Está en contacto con $\alpha 5$ (F156).
D57, T58 y A59, G60	Forman parte del sitio de unión de Mg/fosfato PM3. T58 contacta a su vez con $\beta 1$ (V8).
A146	Parte del sitio G3
V152, F156	Residuos más conservados de $\alpha 5$, contactan fuertemente con $\alpha 1$ y $\beta 3$.
Cluster C2: $\beta 4$ (F82), L6 (I84), $\alpha 3$ (S89, F90), $\beta 5$ (L113, V114, G115), L8 (L120, V125), $\alpha 4$ (A134), $\beta 6$ (Y141, E143).	
F82, I84	Parte del bolsillo hidrofóbico que rodea a la base de G. F82 contacta, además, con $\alpha 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ y L8.
S89	Está en contacto con L1 (V14), del cluster 1.
F90	Contacto α/β con $\beta 4$ (F82).
L113, V114	Bolsillo hidrofóbico de la base G.
G115	Una cadena lateral en esta posición chocaría con F82.
L120	Contacta con K117 en G2 y con $\beta 4$.
V125	Contacta con $\beta 4$ y con $\alpha 3$.
A134	Contacto fuerte α/β con $\beta 5$ (L113) y $\beta 6$ (Y141).
Y141	Contacta con $\beta 4$, $\beta 5$ y $\alpha 4$.
E143	Forma un enlace de H con Y141 y un puente salino con R123. Este residuo se conserva tan solo en la subfamilia Ras.
Residuos que no están en contacto con los cluster: $\beta 1$ (K5, V7, G10), L2 (F28, Y32, I36), L3 (D47), L4 (Q61, E62), L8 (N116, K117, D119), L10 (S145).	
G10	Parte de PM1.
F28	Contacta con la base de guanina (sitio de unión de G1).
I36, E62	Contacto mutuo.
Q61	Parte de PM3.
N116, K117 y D119	Contactan con la base de guanina (sitio de unión G2), D119 también contacta con S145.
S145	Contacta con D119 en G2 y también forma parte del sitio de unión de guanina G3.
K5	Residuo muy expuesto, puede mantener contactos funcionales externos.
V7	Se encuentra en la hélice $\beta 1$ y contacta con Y71, de la $\beta 2$.
Y32	Puede interaccionar con las proteínas GAP.
D47	Horquilla β , $\beta 1/\beta 3$. Residuo muy expuesto. Puede mantener contactos funcionales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

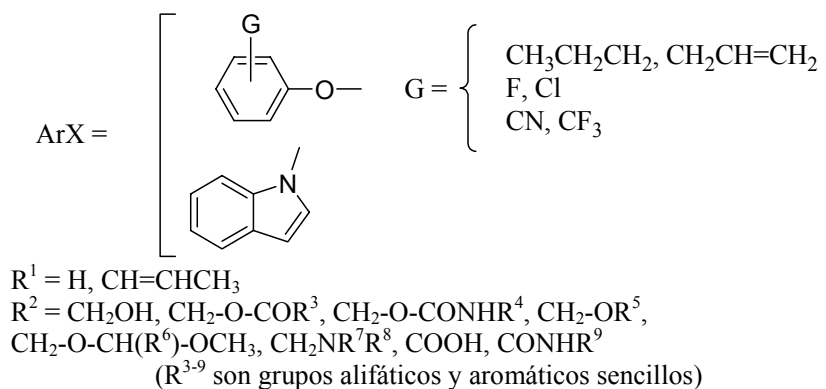
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SÍNTESIS DE LOS NUEVOS DERIVADOS DE ESTRUCTURA GENERAL I

Con objeto de mejorar las propiedades biológicas del cabeza de serie, **EHT0459**, se han considerado diferentes modificaciones estructurales en los compuestos de estructura general **I** (Esquema 4.1). Así, conservando en todos los compuestos el anillo de 4*H*-piran-4-ona y el espaciador metilénico, se han llevado a cabo modificaciones en distintas zonas de la molécula, la región aromática ArX y los sustituyentes R¹ y R² del anillo de 4*H*-piran-4-ona.



donde:



Esquema 4.1.

Las variaciones en la región aromática incluyen éteres aromáticos, en los que se ha modificado el número y la naturaleza de los sustituyentes del anillo bencénico, introduciendo cadenas hidrocarbonadas saturadas e insaturadas, halógenos (Cl, F) y grupos electroattractores (CF₃, CN).

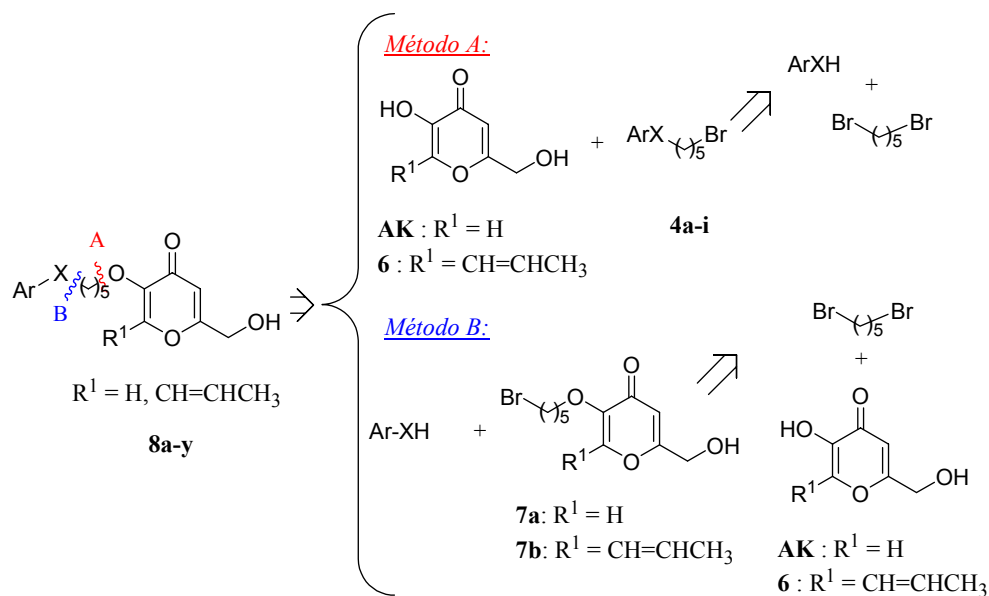
Por otro lado, también se ha considerado el anillo de indol como modificación de la región aromática, ya que incluye un heteroátomo, X = N, dentro del anillo aromático, que permite estudiar este nuevo efecto.

En el anillo de 4*H*-piran-4-ona se han modificado dos posiciones, la primera de ellas, R¹, dejándola libre (R¹ = H) o introduciendo un grupo propenilo; mientras que en la segunda, R², se ha considerado un barrido de diferentes grupos funcionales, capaces de proporcionar nuevos puntos de interacción entre las moléculas y la proteína, y una mayor biodisponibilidad. De esta manera, sin alterar el estado de oxidación del carbono unido al anillo de 4*H*-piran-4-ona, se han introducido éteres, carbamatos, ésteres, acetales y aminas; y modificando el estado de oxidación de dicho carbono, de CH₂ a CO, se han obtenido ácidos y amidas.

El espaciador metilénico, esencial para conferir flexibilidad a la molécula, se ha mantenido fijo en 5 eslabones.

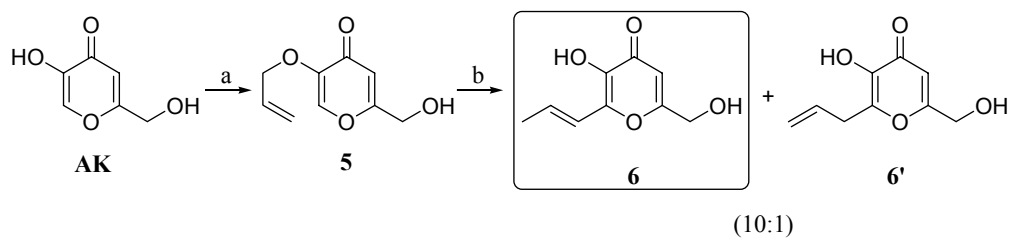
4.1.1. Obtención de los compuestos derivados de hidroximetil-4*H*-piran-4-ona

La síntesis de las hidroximetil-4*H*-piran-4-onas **8a-y**, a partir de ácido kójico comercial (AK), se ha abordado por dos métodos complementarios, A y B, que implican la desconexión retrosintética de las moléculas por dos puntos diferentes, y que se pueden utilizar indistintamente dependiendo de la disponibilidad de los compuestos precursores (Esquema 4.2). El método A conlleva la ruptura de las moléculas por el enlace C-O que une el anillo de piranona con el espaciador, siendo las moléculas precursoras el ácido kójico (R¹ = H, AK) o su análogo **6** (R¹ = (*E*)-CH=CHCH₃) y un aril bromopentil éter **4**, que se obtendría por alquilación del correspondiente fenol o indol con 1,5-dibromopentano. Alternativamente, siguiendo el método B, la desconexión inicial de la piranona se produce en el enlace X-C que une la región aromática ArX al espaciador. Esta ruta lleva implícita la síntesis de los productos intermedios **7a,b**, a partir de ácido kójico o su análogo **6** y 1,5-dibromopentano.



Esquema 4.2.

La obtención de las piranonas intermedias en la síntesis de los compuestos **8a-y** se ha llevado a cabo a partir de ácido kójico comercial. La síntesis del ácido 2-propenilkójico **6** está recogida en el Esquema 4.3.

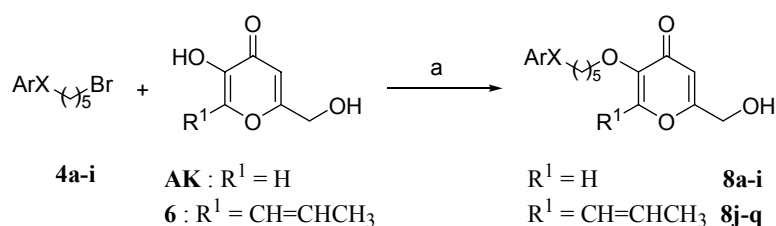


Condiciones de reacción: a) bromuro de alilo, K_2CO_3 , DMF, Ar, 50°C , 48 h; b) horno de bolas, 200°C , vacío (1 mm Hg).

Esquema 4.3.

Por reacción del ácido kójico con bromuro de alilo en medio básico se obtiene el alil éter **5** que, a través de una transposición de Claisen térmica, se transforma en una mezcla de isómeros **6** y **6'** en proporción 10 a 1 respectivamente. El producto de reacción mayoritario no es el que tiene la cadena alílica **6'**, sino **6**, ya que en el mismo medio de reacción ocurre una migración del doble enlace, de manera que se obtiene mayoritariamente el isómero más conjugado de los dos y por tanto el más estable termodinámicamente. A pesar de que la síntesis de **6** ya está descrita en medio ácido¹¹⁷, en nuestro grupo de trabajo hemos puesto a punto la transposición de Claisen en condiciones térmicas, puesto que de este modo el aislamiento de los productos finales es más eficaz. La mezcla de isómeros **6** y **6'** obtenida se utiliza en los siguientes pasos de reacción, observándose en éstos la completa isomerización del grupo alilo a propenilo.

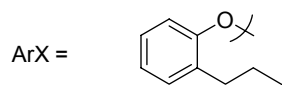
Así, a partir de ácido kójico o de ácido 2-propenilkójico **6**, y siguiendo el método A mostrado en el Esquema 4.2, se ha obtenido una serie de hidroximetil-4*H*-piran-4-onas, **8a-q**, mediante alquilación selectiva del hidroxilo unido directamente al anillo de 4*H*-piran-4-onas, con los derivados halogenados **4a-i** que contienen el espaciador metilénico y la correspondiente región aromática (Esquema 4.4).



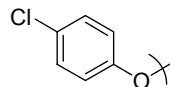
Condiciones de reacción: a) K_2CO_3 , NaI, DMF, 80° C, 24 h.

Esquema 4.4.

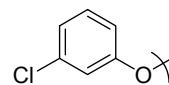
¹¹⁷ (a) McLamore, W. M.; Gelblum, E.; Bavley, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 2816. (b) Hurd, C. D.; Sims, R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71, 2440.



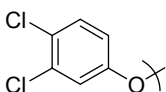
$R^1 = H$, **EHT0459**, *cabeza de serie* (**8a**)
 $R^1 = CH=CHCH_3$, **8j**



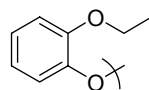
$R^1 = H$, **8b**
 $R^1 = CH=CHCH_3$, **8k**



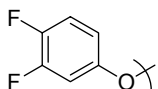
$R^1 = H$, **8c**
 $R^1 = CH=CHCH_3$, **8l**



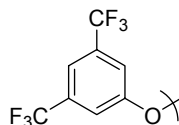
$R^1 = H$, **8d**
 $R^1 = CH=CHCH_3$, **8m**



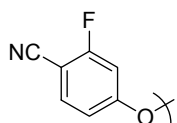
$R^1 = H$, **8e**



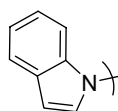
$R^1 = H$, **8f**
 $R^1 = CH=CHCH_3$, **8n**



$R^1 = H$, **8g**
 $R^1 = CH=CHCH_3$, **8ñ**



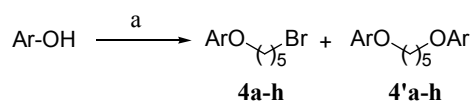
$R^1 = H$, **8h**
 $R^1 = CH=CHCH_3$, **8p**



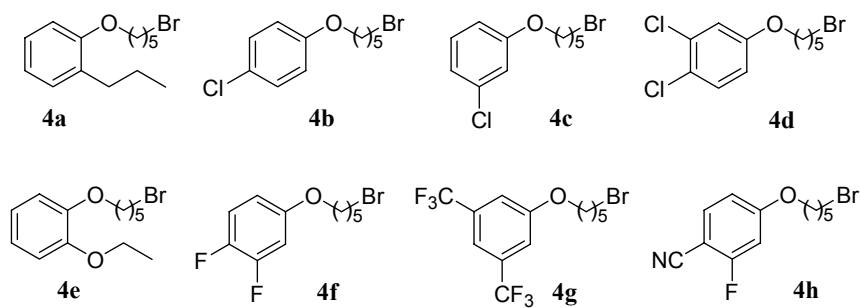
$R^1 = H$, **8i**
 $R^1 = CH=CHCH_3$, **8q**

Esquema 4.4, continuación.

Los derivados halogenados **4a-h** se han obtenido por reacción de alquilación de Williamson de los correspondientes fenoles, empleando exceso del 1,5-dibromopentano en presencia de carbonato potásico, yoduro sódico y utilizando 2-butanona como disolvente. La aparición de cantidades variables de subproductos de dialquilación, **4'**, se ha detectado, en algunas ocasiones, por resonancia magnética nuclear de protón de los crudos de reacción. La formación de estos subproductos disminuye notablemente al aumentar la proporción de derivado dibromado en el medio de reacción (Esquema 4.5).



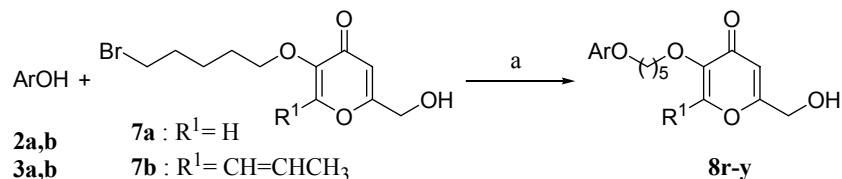
Condiciones de reacción: a) 1,5-dibromopentano (2 eq.), K₂CO₃, NaI, 2-butanona, 80° C, 24 h.



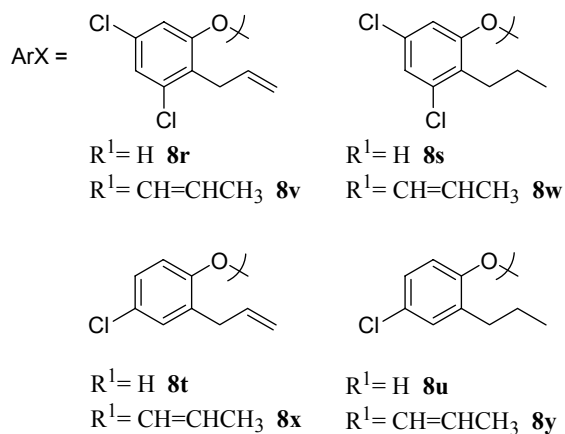
Esquema 4.5.



A continuación, siguiendo el método B, las piranonas **7a,b** se utilizan como agentes alquilantes de los fenoles correspondientes (**2a,b** y **3a,b**), tal y como se muestra en el Esquema 4.8.



Condiciones de reacción: a) K_2CO_3 , NaI, 2-butanona, 80°C , 24 h.

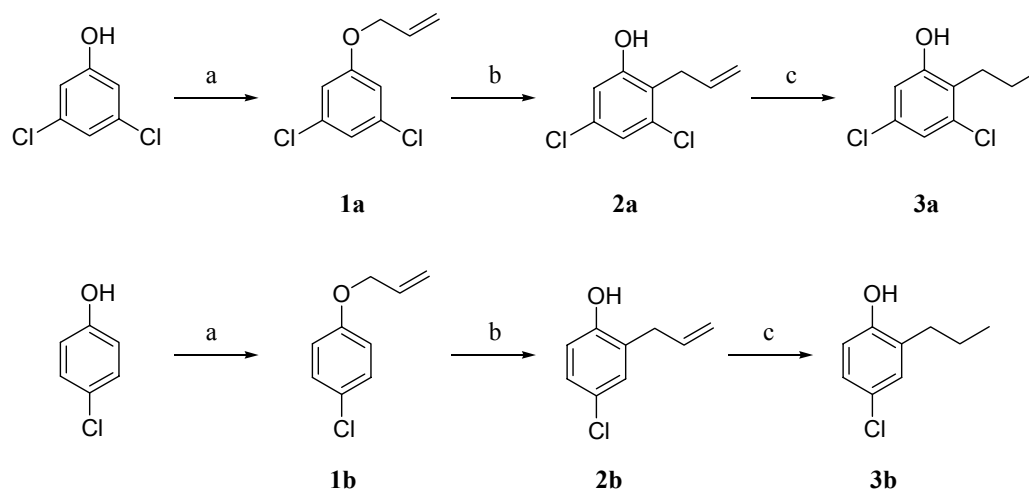


Esquema 4.8.

Tanto el método A como el B se pueden emplear indistintamente para la síntesis de las hidroximetil-4*H*-piran-4-onas finales y, como se puede observar, el método B implica un menor consumo de los fenoles de partida, por lo que es el más indicado para la obtención de los compuestos que procedan de fenoles no comerciales, como **2a,b** y **3a,b**.

Estos fenoles se obtienen mediante una ruta sintética que implica el tratamiento de los correspondientes fenoles comerciales (*p*-clorofenol y 3,5-diclorofenol) con bromuro de alilo en presencia de carbonato potásico. De esta manera se obtienen los alil aril éteres **1a,b**, que

por transposición de Claisen se transforman en los 2-alilfenoles **2a,b**¹¹⁹, compuestos que pueden emplearse como precursores para la obtención de (hidroximetil)-4*H*-piran-4-onas, o seguir transformándose, por hidrogenación catalítica, para dar lugar a los 2-propilfenoles **3a,b** (Esquema 4.9).



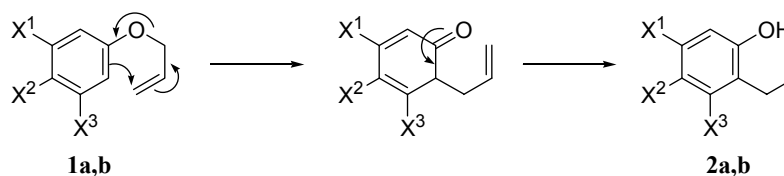
Condiciones de reacción: a) bromuro de alilo, K₂CO₃, NaI, 2-butanona, 80° C, 24 h.;
b) etilenglicol, 200 °C, 2 h.; c) H₂, Ni-Raney, tolueno:etanol.

Esquema 4.9.

La peculiaridad de estos fenoles radica en que el proceso de transposición de Claisen da lugar a un único regioisómero, ya que los éteres alílicos de partida, **1a,b**, son simétricos. A pesar de esta simplificación, la búsqueda de las condiciones adecuadas fue tediosa, debido a que las altas temperaturas requeridas para estos procesos no permitían una reproducción factible de las condiciones de reacción.

¹¹⁹ (a) DE 234297, **1974**, Ciba-Geigy. [Chem. Abst. 80, 145774]. (b) Ashton, M. J.; Hills, S. J.; Newton, C. G.; Taylor, J. B.; Tondou, S. C. D., *Heterocycles*, **1989**, 28, 1015. (c) Bigi, F.; Casiraghi, G.; Casnati, G.; Sartori, G., *Synthesis*, **1981**, 310.

En la Tabla 4.1 y en el Esquema 4.10 se recoge un resumen de todas las condiciones empleadas. Inicialmente, la transposición sigmatrópica se llevó a cabo sin disolvente, calentando a 200° C en un baño de grafito y bajo atmósfera de argón. Sin embargo, estas condiciones resultaron ser poco reproducibles y conducían, en un gran número de ocasiones, a la descomposición de los materiales de partida, incluso cuando el calentamiento se realizaba en el horno de bolas, donde cabía esperar la destilación de los productos de reacción (entradas 1 y 2). También se probaron otras condiciones, como la adición de ácidos de Lewis (AlCl₃, por ejemplo), que debería acelerar el proceso tipo Claisen, y en estos casos se obtuvo una mezcla compleja de productos de reacción (entrada 3). Por otro lado se probó también la adición de disolventes de elevado punto de ebullición (entradas 4 y 5); mientras que calentando los alil éteres **1a,b** en *p*-cimeno a 180° C se recuperan los compuestos de partida inalterados, cuando la reacción se lleva a cabo en etilenglicol a 200 °C se obtienen los 2-alilfenoles **2a,b** con un rendimiento constante (56-58 %), en tan solo 2 h. Por tanto, éstas fueron las condiciones que finalmente se emplearon para sintetizar **2a,b**¹²⁰.



Esquema 4.10.

¹²⁰ (a) Box, V. G. S.; Melelies, P. C., *Heterocycles*, **1998**, 48, 2173. (b) Goering, H. L.; Jacobson, R. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 3277.

Tabla 4.1. Condiciones experimentales empleadas en la transposición de Claisen.

Entrada	Condiciones de reacción	Resultados (¹ H-RMN)
1	180-200 °C / Ar / 3 h	2a,b (20 %) + 1a,b (20 %)
2	160 °C / horno de bolas / 10 min	1a,b y descomposición
3	10 °C / CH ₂ Cl ₂ / AlCl ₃ (0,1 M) / 2 h	mezcla compleja de productos
4	180 °C / <i>p</i> -cimeno / Ar / 4 h	compuestos de partida
5	200° C / etilenglicol / Ar / 2 h	2a,b (56-58 %)

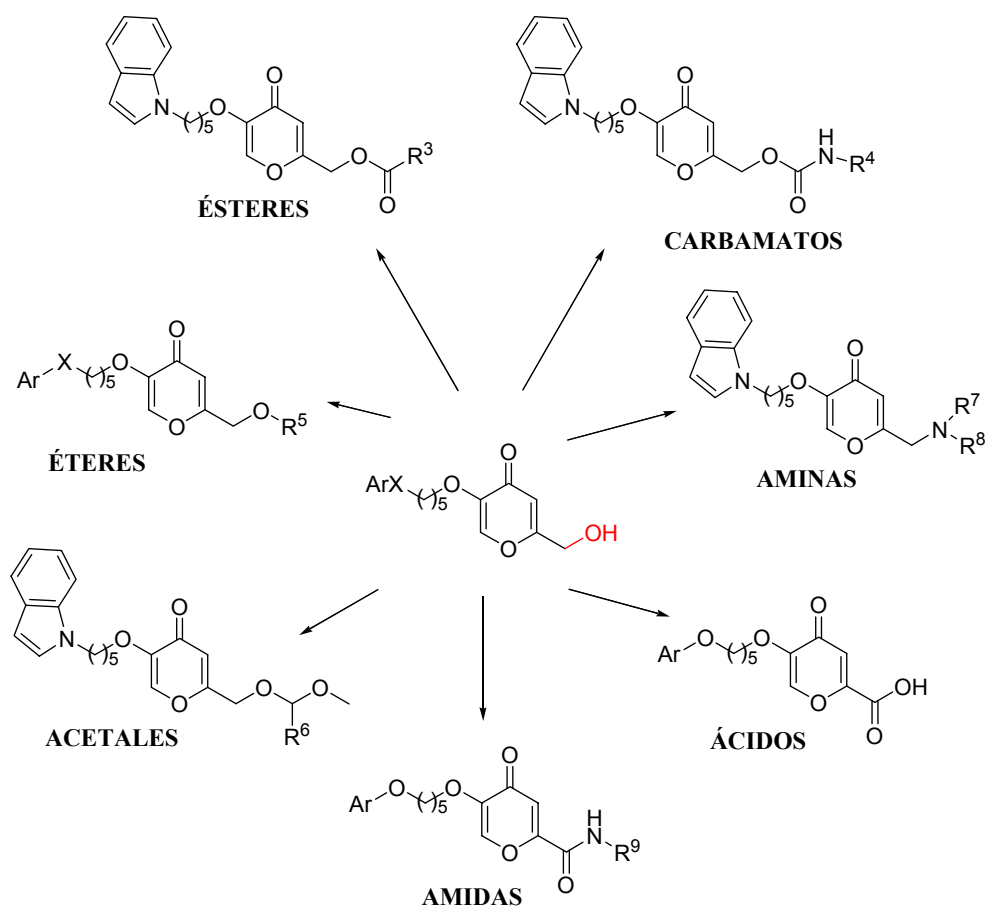
4.1.2. Modificaciones en el sustituyente R²

Una vez sintetizadas las diferentes hidroximetil-4*H*-piran-4-onas se procedió a realizar cambios en el sustituyente R², grupo hidroximetilo, unido al anillo de piranona. En nuestro grupo de investigación se consideró interesante introducir diversos grupos funcionales en esta posición, con el fin de aumentar la solubilidad en medio acuoso y mejorar las propiedades de biodisponibilidad.

En primer lugar se consideraron grupos funcionales que no modificasen el estado de oxidación del carbono unido a la piranona, conservando prácticamente inalteradas las propiedades electrónicas de la nube π del anillo de 4*H*-piran-4-ona. Así, dentro de este grupo, se ha sintetizado una familia de compuestos que incluye ésteres, carbamatos, éteres, acetales y aminas (Esquema 4.11).

Por otro lado, se han considerado también grupos funcionales en los que el carbono unido al anillo de 4*H*-piran-4-ona se ha oxidado de CH₂ a CO, como los ácidos y las amidas (Esquema 4.11).

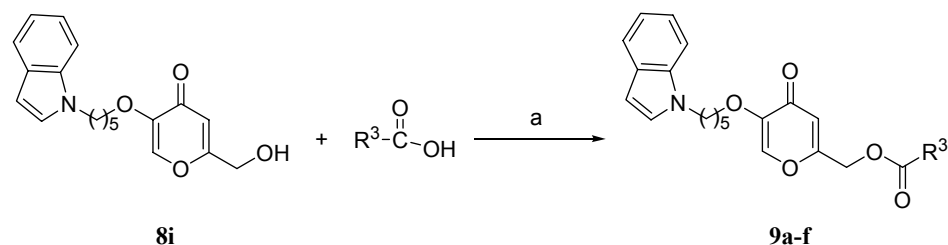
Los nuevos sustituyentes que se introducen en estas modificaciones (R³-R⁹) se han elegido como ejemplos representativos de fragmentos alifáticos y aromáticos sencillos en función de su accesibilidad.



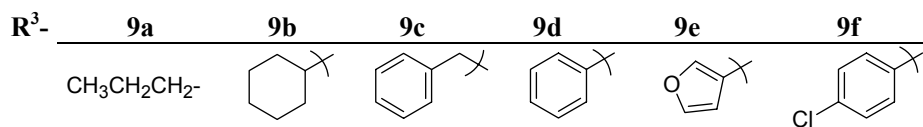
Esquema 4.11.

4.1.2.1. Ésteres

Todos los ésteres sintetizados, **9a-f**, fueron obtenidos a partir de **8i** por tratamiento con los ácidos correspondientes, empleando dicitohexilcarbodiimida y siguiendo un procedimiento estándar¹²¹ (Esquema 4.12). Las reacciones transcurren con rendimientos entre moderados y buenos en estas condiciones.



Condiciones de reacción: a) DCC, DMAP, CH₂Cl₂, desde 0 °C hasta temperatura ambiente.



Esquema 4.12.

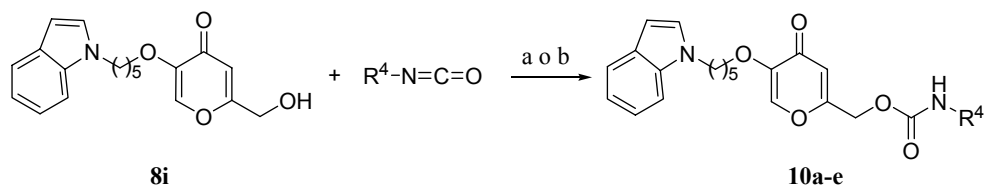
4.1.2.2. Carbamatos

Los carbamatos **10a-e** fueron sintetizados por dos métodos diferentes, en función de su naturaleza alquímica o arílica, siguiendo métodos previamente descritos para la síntesis de carbamatos análogos. Así, para los carbamatos **10a,b**, en los que el sustituyente R⁴ es alquílico, la reacción tiene lugar por tratamiento del alcohol primario, **8i**, con cloruro cuproso y el correspondiente alquilisocianato en *N,N*-dimetilformamida anhidra¹²², mientras que para los compuestos con R⁴ igual a un grupo aromático (**10c-e**), se necesita la presencia

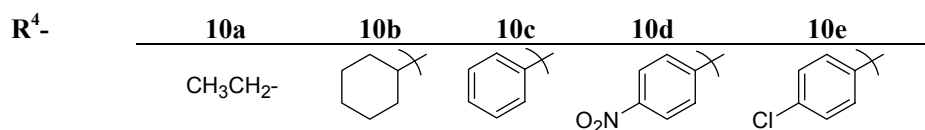
¹²¹ Vowinkel, E., *Chem. Ber.*, **1966**, 99, 42.

¹²² Duggan, M. E.; Imagire, J. S., *Chem. Comm.*, **1989**, 131.

de trietilamina y el arilisocianato correspondiente, en THF anhidro¹²³. Ambos procesos transcurren a temperatura ambiente (Esquema 4.13).



Condiciones de reacción: a) CuCl, DMF, $R^4\text{N}=\text{C}=\text{O}$ (R^4 = alquilo), 20 min., temperatura ambiente, **10a,b**. b) Et₃N, Ar-N=C=O, THF, 24 h, temperatura ambiente, **10c-e**.

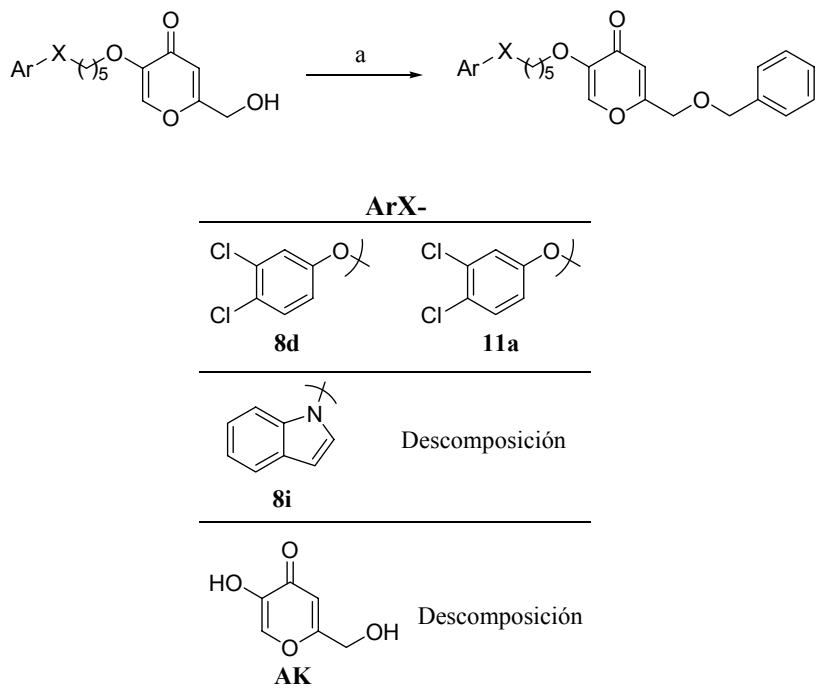


Esquema 4.13.

4.1.2.3. Éteres y acetales

La síntesis de los éteres bencílicos se abordó inicialmente mediante la alquilación de las hidroximetil-4*H*-piran-4-onas **8** con bromuro de bencilo, en presencia de hidruro sódico como base. Estas condiciones son poco reproducibles y dan lugar a la descomposición de los compuestos de partida (Esquema 4.14). Únicamente partiendo de la hidroximetil-4*H*-piran-4-ona **8d** se consiguió obtener un 52 % del bencil éter **11a**. Aplicando estas mismas condiciones en los casos de **8i** y ácido kójico, se produjeron crudos de reacción complejos, en los que no se pudieron identificar los productos de bencilación deseados. Este hecho hizo que en nuestro grupo de investigación se optase por condiciones de bencilación que transcurriesen en medio ácido.

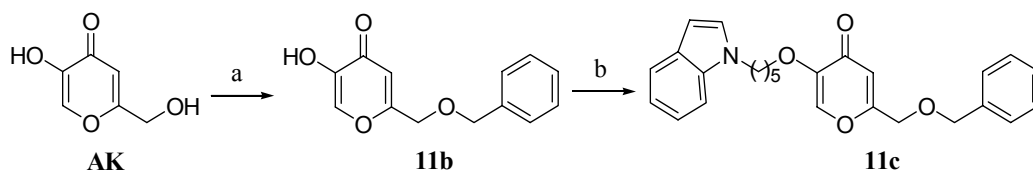
¹²³ Griffin, R. J.; Evers, E.; Davison, R.; Gibson, A. E.; Layton, D.; Irwin, W. J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1996**, 1205.



Condiciones de reacción: a) NaH, *n*-Bu₄NI, PhCH₂Br, THF, 12 h, desde 0° C hasta temperatura ambiente.

Esquema 4.14.

De este modo, por tratamiento del ácido kójico con 2,2,2-tricloroacetimidato de bencilo¹²⁴ en CH₂Cl₂ como disolvente, en presencia de una cantidad catalítica de ácido triflico y bajo atmósfera de argón, se obtuvo el éter bencílico deseado **11b**. El rendimiento de esta reacción es bajo ($\approx 20\%$), probablemente debido a la escasa solubilidad del ácido kójico en el disolvente de la reacción. Finalmente, la alquilación del éter bencílico **11b** con 1-(5-bromopentil)-1*H*-indol, **4i**, en presencia de carbonato de cesio como base, condujo al éter bencílico **11c** (Esquema 4.15).



Condiciones de reacción: a) 2,2,2-tricloroacetimidato de bencilo, CH₂Cl₂, CF₃SO₃H, desde 0° C hasta temperatura ambiente; b) 1-(5-bromopentil)-1*H*-indol (**4i**), Cs₂CO₃, DMF.

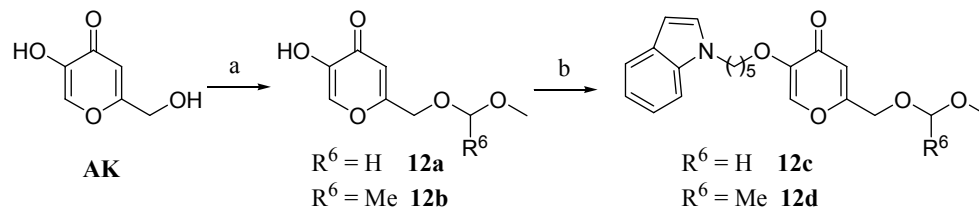
Esquema 4.15.

La síntesis de los acetales **12c,d** se llevó a cabo mediante una estrategia paralela a la de los éteres, en la que el grupo funcional (R²) se introduce inicialmente sobre el ácido kójico y, posteriormente, se une al indol con la cadena alquílica espaciadora. Así, mediante la transacetilación del ácido kójico con el correspondiente acetal, en CH₂Cl₂ como disolvente, y una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador, bajo atmósfera de argón y en presencia de tamices moleculares¹²⁵, se obtuvieron los acetales **12a,b**, aunque con bajos rendimientos, de nuevo debido a la baja solubilidad del ácido kójico en el medio de reacción. Con el empleo de otros disolventes, como THF o DMF, la reacción no tuvo lugar, y se ha observado que los rendimientos de reacción disminuyen notablemente al aumentar la sustitución de los compuestos de partida, hasta el punto de no obtenerse reacción alguna

¹²⁴ (a) Patil, V. J., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 1481. (b) Liu, C.; Coward, J. K., *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 2094.

¹²⁵ Coutts, S. J.; Wallace, T. W., *Tetrahedron*, **1994**, 50, 11755.

cuando se emplea como reactivo el dimetilacetal de la acetona. La sustitución nucleófila de **12a,b** con el bromuro **4i** condujo a los compuestos deseados **12c,d**, con elevados rendimientos (Esquema 4.16).

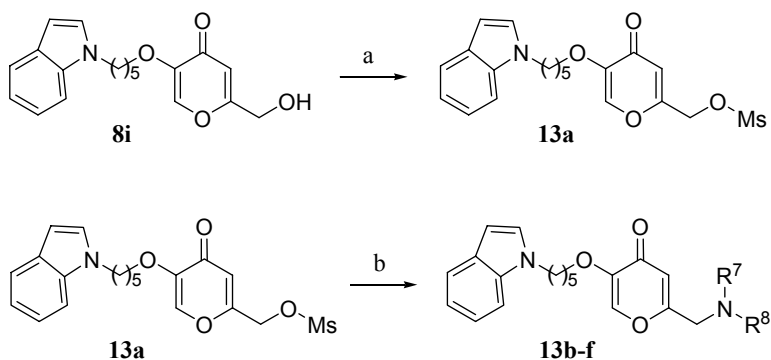


Condiciones de reacción: a) $(\text{MeO})_2\text{CHR}^6$, CH_2Cl_2 , PTSA, 40-50° C, tamiz molecular (3Å);
b) 1-(5-bromopentil)-1*H*-indol (**4i**), Cs_2CO_3 , DMF.

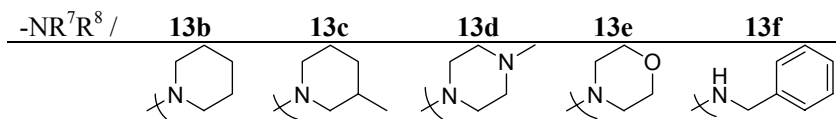
Esquema 4.16.

4.1.2.4. Aminas

La obtención de las aminas **13b-f** se realizó mediante desplazamiento del mesilato intermedio **13a**, por las aminas correspondientes¹²⁶. Así, la hidroximetil-4*H*-piran-4-ona **8i** se hizo reaccionar con cloruro de metanosulfonilo para generar el compuesto mesilado **13a**, el cual, en presencia de las distintas aminas nucleófilas permite una rápida sustitución de tipo S_N2, dando lugar a la familia de aminas de diversas estructuras (Esquema 4.17).



Condiciones de reacción: a) CH₃SO₂Cl (MsCl), Et₃N, CH₂Cl₂, 2 h, desde 0° C hasta temperatura ambiente; b) HNR⁷R⁸, CH₂Cl₂, 2-4 h, 45° C.

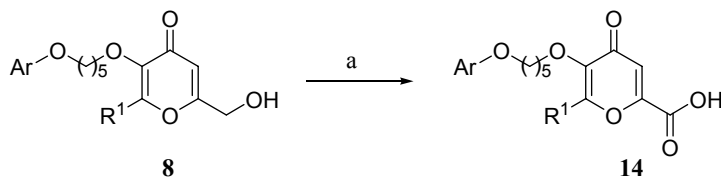


Esquema 4.17.

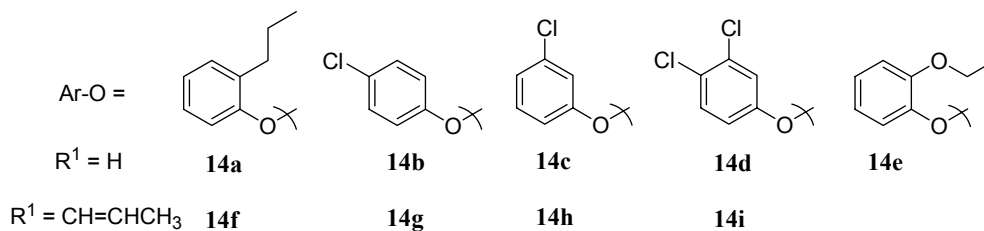
¹²⁶ Wu, E. S.; Loch, J. T.; Toder, B. H.; Borrelli, A. R.; Gawlak, D.; Radov, L. A.; Gensmantel, N. P., *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 3519.

4.1.2.5. Ácidos y amidas

La síntesis de los ácidos **14a-i**, a partir de las hidroximetil-4*H*-piran-4-onas **8**, se ha llevado a cabo utilizando uno de los reactivos oxidantes más habituales: el reactivo de Jones¹²⁷. Este reactivo combina compuestos de cromo (VI) (CrO₃) con un medio ácido acuoso (H₂SO₄-H₂O). El disolvente empleado en estas reacciones es acetona, para asegurar así que el medio de reacción es homogéneo (Esquema 4.18).



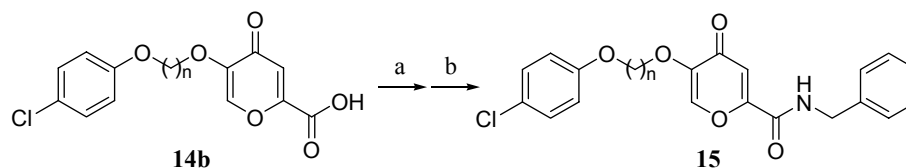
Condiciones de reacción: a) Reactivo de Jones (CrO₃ / H₂SO₄-H₂O), acetona, 2-3 horas, desde 0° C hasta temperatura ambiente.



Esquema 4.18.

¹²⁷ Hare, L. E.; Lu, M. C.; Sullivan, C. B.; Sullivan, P. T.; Counsell, R. E., *J. Med. Chem.*, **1974**, *17*, 1.

Finalmente, uno de estos ácidos, **14b**, se transformó en la amida derivada de la bencilamina, por formación *in situ* del cloruro de ácido con cloruro de oxalilo (Esquema 4.19)¹²⁸.



Condiciones de reacción: a) ClCOCOCl, DMF, CH₂Cl₂, 2 h, temperatura ambiente;
b) Ph-CH₂NH₂, CH₂Cl₂, 5 h, temperatura ambiente.

Esquema 4.19.

¹²⁸ Corey, E. J.; Cashman, J. R.; Kantner, S. S.; Wright, S. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 1503.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

Los ensayos biológicos han sido realizados en Francia, en los laboratorios Exonhit Therapeutics (EHT).

En todos los compuestos sintetizados¹²⁹ se determinó su capacidad citotóxica en líneas tumorales celulares de adenocarcinoma de colon (HCT116) y carcinomas de pulmón (H460) y mama (MDA231 y MCF7). Como control de selectividad se utilizaron las líneas celulares no tumorales de mama MCF10A y MRC5, y de fibroblastos de ratón NIH3T3. Adicionalmente, en aquellos compuestos que presentaron un perfil óptimo, tanto en potencia como en selectividad, se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento independiente de matriz y la migración celular de las células tumorales. Por último, se estudió si el mecanismo implicado en la inducción de la citotoxicidad tumoral se debía a una acción inhibitoria directa sobre la proteína Ras.

De todas las pruebas biológicas realizadas, las más interesantes son las cuatro que se describen a continuación, los estudios de citotoxicidad, el crecimiento independiente de matriz, la migración celular y la dependencia de la vía de señalización Ras. Como control positivo de la inhibición de la señalización mediada por proteínas G monoméricas se ha utilizado el carboxamido-amino-imidazol (CAI) de Merck L-651,582¹³⁰.

4.2.1. Cultivos celulares y estudios de citotoxicidad

La citotoxicidad de los derivados de 4*H*-piran-4-ona sintetizados se determinó utilizando el método del MTT (*thiazolyl blue tetrazolium bromide*) descrito por Carmichael y colaboradores¹³¹, con algunas variaciones. Para ello, la línea celular de interés se incubó en presencia o ausencia de una serie de concentraciones del compuesto objeto de estudio durante el tiempo adecuado. La citotoxicidad inducida por el compuesto de interés se

¹²⁹ Leblanc, V.; Leblond, B.; Melle-Milovanovic, D.; López-Rodríguez, M. L.; Viso, A.; Beausoleil, E.; Picard, V.; Piñar, C.; Taverne, T., WO 03/074508, **2003**.

¹³⁰ Khon E. C.; Liotta, L. A., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1990**, 82, 54.

¹³¹ Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B., *Cancer Res.*, **1987**, 47, 936.

cuantificó mediante técnicas espectrofotométricas, midiendo la absorbancia a 550 nm (A_{550}). A partir de los valores de A_{550} se calculó la fracción de células supervivientes, se realizó la curva dosis respuesta y se obtuvieron los valores de CI_{50} correspondientes. En las Tablas 4.2 y 4.3 se recogen algunos datos representativos, donde se puede observar que la mayoría de los compuestos sintetizados presenta potentes efectos citotóxicos en las líneas celulares tumorales ensayadas, encontrando, en algunos casos, una notable selectividad frente a células sanas.

Tabla 4.2. Ensayos de citotoxicidad en cultivos celulares tumorales.

Comp.	Citotoxicidad (CI_{50} μ M)			
	H460	HCT116	MDA231	MCF7
8a	40	35	>50	30
8b	25	50	10	>50
8c	25	>50	10	50
8d	15	50	>50	35
8e	25	50	>50	17
8f	>50	>50	>50	>50
8g	35	>50	45	>50
8h	20	15	>30	10
8i	18	18	ND	ND
8j	25	20	25	20
8k	35	>50	40	>50
8l	20	50	>50	25
8m	35	50	30	45
8n	15	20	15	10
8ñ	15	12	9,0	9,0
8p	40	45	30	30
8q	22	33	13	ND
8r	40	11	25	30
8s	ND	8,2	ND	ND
8t	10	7,0	9,0	10
8u	10	10	20	20
8v	10	9,1	8,0	8,0
8w	10	10	>10	>10
8x	8,6	8,7	12	11
8y	8,0	4,0	11	10
9a	ND	152	ND	ND
9b	38	ND	30	ND
9c	ND	>100	ND	ND
9d	44	43	40	ND
9e	32	70	68	ND

Tabla 4.2, continuación. Ensayos de citotoxicidad en cultivos celulares tumorales.

Comp.	Citotoxicidad (CI ₅₀ μ M)			
	H460	HCT116	MDA231	MCF7
9f	ND	>150	ND	ND
10a	25	23	18	ND
10b	8,0	7,1	9,8	ND
10c	80	30	19	ND
10d	ND	13	ND	ND
10e	ND	>100	ND	ND
11a	6,3	7,5	22	13
13b	ND	32	ND	ND
13c	ND	18	ND	ND
13d	ND	36	ND	ND
13e	ND	72	ND	ND
13f	ND	15	ND	ND
14a	>50	>50	>50	>50
14b	>50	>50	>25	17
14c	>50	>50	20	>50
14d	>50	>50	>25	30
14f	>50	>50	>50	>50
14g	>50	>50	>50	>50
14h	>50	>50	>50	>50
15	10	25	5,0	>25

ND es no determinado.

Tabla 4.3. Datos representativos de citotoxicidad en células sanas.

Comp.	Citotoxicidad (CI ₅₀ μ M)		
	NIH3T3	MCR5	MCF10A
8a	ND	ND	50
8e	>50	ND	ND
8j	50	35	>50
11a	40	20	>50
15	ND	17	>50

ND es no determinado.

4.2.2. Crecimiento independiente de matriz (CIM) o crecimiento tridimensional (3D)

La evaluación del efecto de los compuestos sintetizados en la capacidad para inhibir el crecimiento independiente de la matriz extracelular se llevó a cabo utilizando células tumorales HCT116 en soportes de agar o matrigel, en aquellos compuestos que presentan citotoxicidad.

Para ello, las células HCT116 se sembraron sobre agar o matrigel en presencia o ausencia de una serie de concentraciones del compuesto objeto de estudio. Tras un periodo de incubación de una semana se determinó tanto la viabilidad celular, mediante el método del azul de Trypan, como la capacidad de crecimiento tridimensional, mediante microscopía de contraste. Algunos datos representativos están recogidos en la Tabla 4.4, observándose capacidades de moderadas a buenas (comprendidas entre 25 y 4 μM) para inhibir el crecimiento independiente de matriz.

Tabla 4.4. Datos representativos de la inhibición del crecimiento independiente de matriz en soporte de matrigel.

Compuesto	CIM (CI_{50} μM)
8a	4
8h	>30
8i	15
8l	12
8m	<25
8n	10-30

4.2.3. Migración

El ensayo de migración se realizó empleando una cámara Boyden¹³², en cuyo compartimento superior se colocaron las células MDA-MB231 previamente incubadas en presencia o ausencia de una serie de concentraciones del compuesto objeto de estudio, mientras que en el inferior se introdujo la concentración apropiada del compuesto a analizar. Tras un periodo de incubación de seis horas se cuantificó la migración celular mediante microscopía óptica. Sin embargo, ninguno de los compuestos ensayados mostró una capacidad significativa de inhibición de la migración celular.

4.2.4. Dependencia de la vía de señalización Ras

El efecto de los compuestos sintetizados en la vía de señalización Ras se analizó, por un lado, mediante los sistemas *reporter* descritos por Imler¹³³ y Lin¹³⁴; y, por otro, cuantificando la formación de colonias de la línea celular NIH3T3 (fibroblastos de ratón) previamente transfectados para expresar una forma de proteína Ras constitutivamente activada, debido a la sustitución de su glicina en posición doce por una valina (RasVal12).

Los resultados obtenidos indican que el mecanismo de inducción de citotoxicidad de los distintos derivados de 4*H*-piran-4-ona varía en función de cómo sea la subunidad aromática (Ar, en la estructura general **I**). Mientras que todos los compuestos con un anillo bencénico como subunidad aromática, a los que denominaremos serie 1, muestran actividad en la vía de señalización dependiente de Ras, todos aquellos cuya subunidad aromática es un grupo indol (serie 2) resultan inactivos en este ensayo y, por tanto, deben de ejercer su efecto actuando mediante otros mecanismos de acción distintos.

¹³² Albini, A.; Iwamoto, Y.; Kleinmann, H. K.; Martin, G. R.; Aaronson, S. A.; Kozlowski, J. M.; McEwan, R. N., *Cancer Res*, **1987**, 47, 3239.

¹³³ Imler, J. L.; Schatz, C.; Wasylyk, C.; Chatton, B.; Wasylyk, B., *Nature*, **1988**, 332, 275.

¹³⁴ Migone, T. S.; Lin, J. X.; Cereseto, A.; Mulloy, J. C.; O'Shea, J. J.; Franchini, G.; Leonard, W. J., *Science*, **1995**, 269, 79.

4.3. RELACIÓN ESTRUCTURA-CITOTOXICIDAD: ANÁLISIS COMPARATIVO DEL CAMPO MOLECULAR (QSAR-3D / CoMFA)

Con objeto de conocer la interacción de los compuestos de la serie 1 con la proteína Ras, se han llevado a cabo estudios QSAR-3D (*3D quantitative structure-activity relationship*) mediante la metodología del análisis comparativo del campo molecular (CoMFA, *comparative molecular field analysis*)¹³⁵, los cuales permitirán establecer la relación entre la citotoxicidad de esta nueva clase de compuestos antitumorales y su estructura.

4.3.1. Criterios de superposición

Para que un análisis QSAR-3D tenga un buen valor predictivo es fundamental elegir adecuadamente la conformación bioactiva a partir de la cual se realizará la superposición de los diferentes ligandos. La selección de una determinada estructura 3D de entre varios conformeros de una molécula puede determinarse a partir de datos experimentales cristalográficos o de resonancia magnética nuclear (RMN), o bien de modelos obtenidos por medio de distintos protocolos, como los mínimos cuadrados, el ajuste múltiple (*multiple fit*) o el ajuste de campo (*field fit*)¹³⁶.

Dado que la presencia del espaciador alifático $-(CH_2)_n-$ confiere una gran flexibilidad conformacional a los derivados de 4*H*-piran-4-ona objeto de estudio, se optó por basar la elección de la conformación bioactiva en los datos experimentales de RMN de dos compuestos representativos en disolución.

Así, se eligieron los compuestos **8r** y **14b** como representativos de las (hidroximetil)-4*H*-piran-4-onas y de los ácidos 4-oxo-4*H*-piran carboxílicos, respectivamente (Figura 4.1).

Los experimentos que se describen a continuación se llevaron a cabo en un equipo de 500 MHz a una temperatura de 298 K. El compuesto **8r** se disolvió en acetonitrilo deuterado (CD₃CN), mientras que el ácido **14b** se solubilizó en agua deuterada (D₂O).

¹³⁵ (a) Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *110*, 5959. (b) Clark, M.; Cramer, R. D.; Jones, D. M.; Patterson, D. E.; Simeroth, P. E., *Tetrahedron Comput. Method.*, **1990**, *3*, 47. (c) Podlogar, B. L.; Ferguson, D. M., *Drug Des. Discov.*, **2000**, *17*, 4.

¹³⁶ Kearsley, S. K.; Smith, G. M., *Tetrahedron Comput. Method.*, **1990**, *3*, 615.

Para determinar la distribución conformacional de estos dos compuestos se realizaron los correspondientes espectros de protón (^1H) y carbono trece (^{13}C) y diferentes espectros bidimensionales COSY, HMQC, HMBC y NOESY. Los experimentos de correlación a larga distancia ^1H - ^{13}C (HMBC) y ^1H - ^1H (NOESY) se realizaron con diferentes tiempos de evolución y mezcla, con el fin de obtener información de los ángulos diedros y las distancias interprotónicas, respectivamente. En el caso del compuesto **14b**, que se estudió en disolución de agua deuterada, los espectros se realizaron con presaturación de la señal de agua residual (HDO).

En los dos casos estudiados, todos los espectros obtenidos aportan la misma información, lo que indica que ambas moléculas se comportan de manera similar en disoluciones relativamente polares. Cabe destacar que los picos de cruce en los experimentos HMBC más intensos se obtuvieron con un tiempo de evolución de 90 ms, hecho que indica que las constantes de acoplamiento $^n\text{J}_{\text{C-H}}$ son relativamente pequeñas ($<5,5$ Hz). Esta información se obtiene a partir de la relación que existe entre la intensidad observada (I^{obs}) y el tiempo de evolución de las $^n\text{J}_{\text{C-H}}$ (Δ') en segundos, y dos veces la inversa de la constante de acoplamiento carbono-hidrógeno a larga distancia ($^n\text{J}_{\text{C-H}}$), Ecuación [4.1]¹³⁷. Así, se puede decir que las conformaciones más abundantes en disolución son extendidas, con la cadena espaciadora en forma de zig-zag y los ángulos diedros que forma cada anillo con dicha cadena espaciadora también en anti.

$$I^{\text{obs}} \propto \Delta' = 1 / 2^n \text{J}_{\text{C-H}} \quad [4.1]$$

¹³⁷ Bax, A.; Summers, M. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2093.

En la Figura 4.1 se pueden observar los espectros de protón de **8r** y **14b** en acetonitrilo deuterado y agua deuterada, respectivamente. Ambos espectros son muy parecidos. En torno a 1,5-2,0 ppm, se pueden ver las señales de los protones alquílicos, entre 3,5 y 4,0 ppm aparecen los protones de los metilenos unidos a grupos electronegativos y entre 6,4 y 8,0 ppm) se observan los protones del anillo bencénico y de la piranona.

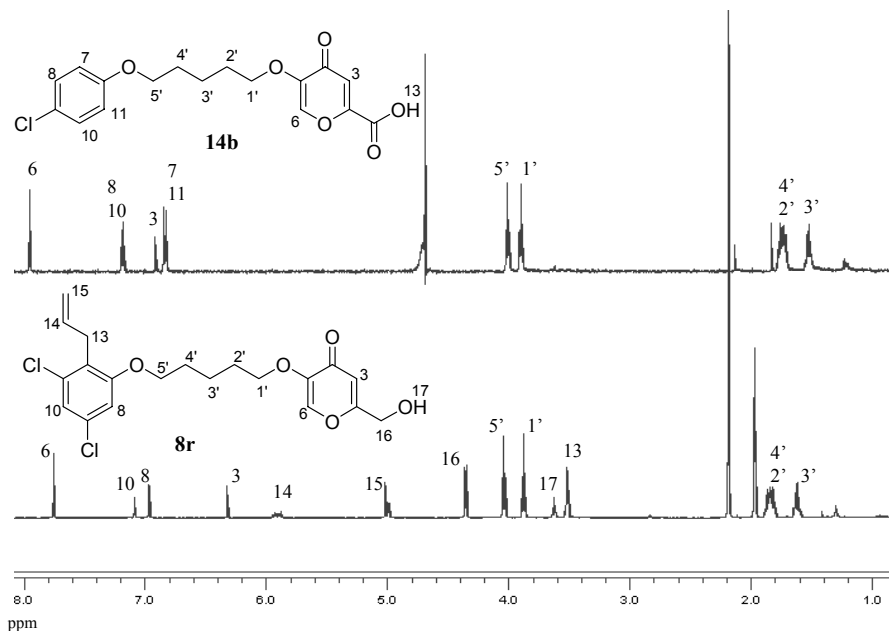


Figura 4.1.

Espectros de protón de **14b** en D₂O y **8r** en CD₃CN.

La asignación de cada señal a su protón correspondiente se llevó a cabo mediante experimentos COSY y NOESY. Por otro lado, la asignación de los carbonos se realizó mediante experimentos HMQC y HMBC. A modo de ejemplo, en la Figura 4.2 se muestra el experimento NOESY con un tiempo de mezcla de 500 ms del compuesto **14b**. En este espectro se observan picos de cruce entre los protones del anillo bencénico H⁷/H¹¹ y la señal de los metilenos H^{4'}/H^{2'}, entre H⁷/H¹¹ y H^{5'} y entre el protón del anillo de piranona (H⁶) y las señales de H^{1'} y H^{2'}/H^{4'}. Estas señales indican que dichos protones se encuentran a una distancia menor de 5 Å en el espacio, lo cual sugiere un ligero plegamiento de los anillos de

fenilo y piranona hacia la cadena alquílica espaciadora. Además, permiten distinguir las señales de los dos CH₂ unidos a oxígeno, H^{1'} y H^{5'}.

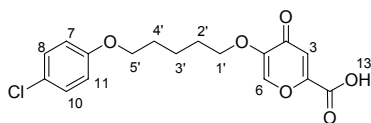
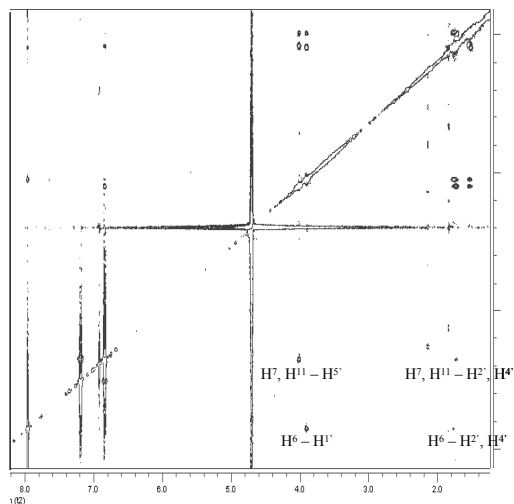


Figura 4.2.

Sección del espectro NOESY de **14b** a 500 ms.

Dado que la intensidad de cada pico de cruce entre dos protones es inversamente proporcional a la distancia entre ambos, $1/r^6$, si se conoce una distancia se pueden calcular, de manera aproximada, todas las demás (Ecuaciones [4.2])¹³⁸.

$$I_{\text{NOE (AB)}} = \alpha A r_{\text{AB}}^{-6}$$

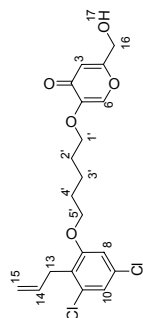
$$I_{\text{NOE (CD)}} = \alpha A r_{\text{CD}}^{-6}$$

$$\frac{I_{\text{NOE (AB)}}}{I_{\text{NOE (CD)}}} = \frac{r_{\text{CD}}^{-6}}{r_{\text{AB}}^{-6}}$$

[4.2]

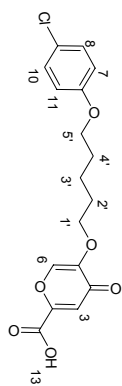
En las Tablas 4.5 y 4.6 están representados, de manera cualitativa, los picos de cruce de los experimentos NOESY de **14b** y **8r**. Una x significa que el pico de cruce entre los dos protones es muy débil, de manera que éstos se encontrarán a una distancia de unos 5 Å aproximadamente; dos x (xx) representa un punto de cruce intermedio, entre dos protones más próximos entre sí y, finalmente, tres x (xxx) quiere decir que en el espectro se observa un pico de cruce muy intenso, lo cual significa que los protones que lo generan se encuentran muy próximos en el espacio (~ 2,5 Å). Un signo – en las Tablas 4.5 y 4.6 indica que no se observa pico de cruce.

¹³⁸ Véase la referencia 99.

Tabla 4.5. NOESY a 900 ms de **8r** en DMSO-d₆.**8r**

Picos	H8	H10	H13	H14	H15	H5'	H4'H2'	H3'	H4'H2'	H1'	H6	H3	H16	OH17
H8	D	m	-	-	-	xxx	x	-	x	-	-	-	-	-
H10	m	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H13	-	-	D	xxx	xxx	-	xx	xx	xx	-	-	-	-	-
H14	-	-	xxx	D	xxx	x	-	-	-	-	-	-	-	-
H15	-	-	xxx	xxx	D	xx	x	x	x	-	-	-	-	-
H5'	xxx	-	-	x	xx	D	xxx	xxx	xxx	-	-	-	-	-
H4'H2'	x	-	xx	-	x	xxx	D	xxx	D	xxx	x	-	-	-
H3'	-	-	xx	-	x	xxx	xxx	D	xxx	xxx	x	-	-	-
H4'H2'	x	-	xx	-	x	xxx	D	xxx	D	xxx	x	-	-	-
H1'	-	-	-	-	-	-	xxx	xxx	D	xxx	xxx	-	-	-
H6	-	-	-	-	-	-	x	x	xxx	xxx	D	-	-	-
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	xx	x
H16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	xx	D	xxx
OH17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	xxx	D

Tabla 4.6. NOESY a 900 ms de **14b** en D₂O.



14b

Picos	H7H11	H8H10	H8H10	H7H11	H5'	H4'H2'	H3'	H2'H4'	H1'	H6	H3
H7H11	D	XX	XX	D	XX	XX	X	XX	-	-	-
H8H10	XX	D	D	XX	-	-	-	-	-	-	-
H8H10	XX	D	D	XX	-	-	-	-	-	-	-
H7H11	D	XX	XX	D	XX	XX	X	XX	-	-	-
H5'	XX	-	-	XX	D	XXX	XXX	XXX	-	-	-
H4'H2'	XX	-	-	XX	XXX	D	XXX	D	XXX	X	-
H3'	X	-	-	X	XXX	D	XXX	XXX	-	-	-
H2'H4'	XX	-	-	XX	XXX	D	XXX	D	XXX	X	-
H1'	-	-	-	-	-	XXX	XXX	XXX	D	XX	-
H6	-	-	-	-	-	X	-	X	XX	D	-
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D

Así, basándonos en estos datos de RMN se superpusieron todas las moléculas de la serie 1 que forman parte del estudio CoMFA (Tabla 4.7) sobre las estructuras **8r** y **14b**. El resultado de la superposición se muestra en la Figura 4.3, donde se observan dos conjuntos ligeramente diferentes de estructuras, las que tienen $R^1 = H$ por un lado, y $R^1 = 1$ -propenilo por otro, que divergen ligeramente en la orientación del espaciador y del grupo aromático.

La optimización geométrica completa de los compuestos de la Serie 1 se llevó a cabo utilizando el método SCF (Hartree Fock) con el programa Gaussian 98¹³⁹.

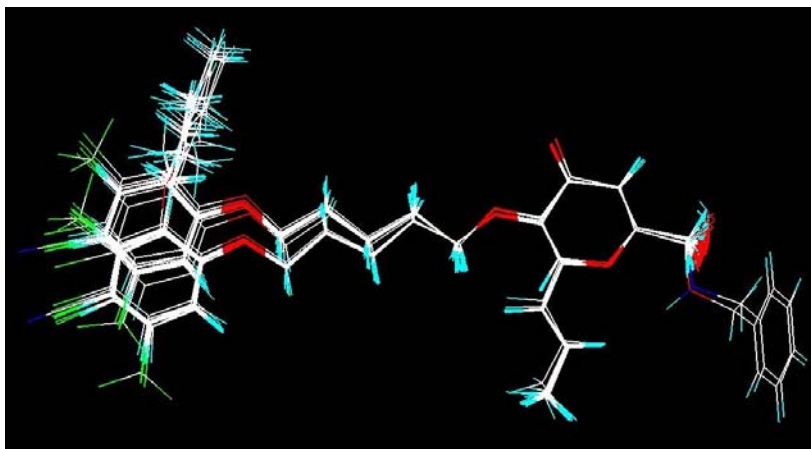


Figura 4.3.

Superposición de los 22 compuestos empleados en la generación del modelo CoMFA.

¹³⁹ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A.; Keith, T. A.; Petersson, G. A.; Raghavachari, K.; Al-Laham, A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, W.; Andres, J. L.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A., Gaussian 98, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.

4.3.2. Metodología CoMFA

Una vez elegidas las conformaciones 3D sobre las cuales se van a superponer todos los ligandos y realizada la superposición, se han de efectuar los cálculos puntuales de la distribución de cargas para las conformaciones elegidas. Para ello, se genera una red 3D con celdillas separadas entre sí 1 o 2 Å, en la que se inscriben los diferentes ligandos. Las energías de interacción estérica (Lennard-Jones) y electrostática (culombica) respecto a un átomo de prueba, también denominado átomo sonda, que suele ser un carbono sp^3 con carga +1,0, se calculan en cada punto de la red 3D.

Mediante la aplicación de la técnica de mínimos cuadrados parciales (PLS, *partial least square*)¹⁴⁰ a la matriz de parámetros, se reduce la dimensionalidad del hiperespacio paramétrico y se extrae el número óptimo de componentes principales, pudiéndose visualizar las ecuaciones QSAR gráficamente en forma de mapas de contorno 3D. Para cada tipo de campo molecular se muestran dos niveles de contorno que revelan las regiones de mayor asociación: las más favorables y las más desfavorables. Estos mapas son de gran utilidad a la hora de sugerir nuevos compuestos que posean una elevada actividad biológica.

En la tabla construida para llevar a cabo el modelo CoMFA se consideran los compuestos como filas y, como columnas, dos tipos de variables: la variable dependiente experimental y una serie de parámetros estructurales como variables independientes, que constituyen el resto de las columnas. Así, la capacidad citotóxica de los compuestos en la línea celular tumoral H460 (variable dependiente) se expresa como una función de los valores de energía de los campos estérico y electrostático, para mimetizar la energía de estabilización del complejo ligando-proteína, y de la energía de solvatación (ΔG_{solv}) como variable independiente adicional en la descripción del modelo QSAR.

El cálculo de las variables independientes empleadas en el análisis se llevó a cabo mediante la combinación de cálculos *ab initio* y técnicas de mecánica molecular. Todos los

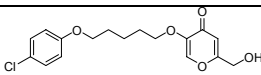
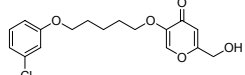
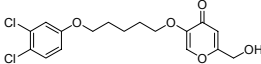
¹⁴⁰ (a) Dunn, W. J. I.; Wold, S.; Edlund, U.; Hellberg, S.; Gasteiger, J., *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1984**, 3, 131. (b) Wold, S.; Ruhe, A.; Wold, H.; Dunn, W. J. I., *SIAM J. Sci. Stat. Comput.*, **1984**, 5, 735. (c) Wold, S.; Albano, C.; Dunn, W. J. I.; Edlund, U.; Esbenson, K.; Geladi, P.; Hellberg, S.; Johansson, E.; Lindberg, W.; Sjöström, M., *Multivariate Data Analysis in Chemistry. In Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry*. Kowalsky, B. R., Reidel: Dordrecht, The Netherlands, **1984**, pp 17-95. (d) Hoskuldsson, A., *J. Chemometrics*, **1988**, 2, 211. (e) Cramer, R. D.; Bunce, J. D.; Patterson, D. E., *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1988**, 7, 18.

cálculos cuánticos se han llevado a cabo con el sistema de programas GAUSSIAN-98¹⁴¹, usando el criterio por defecto para la convergencia. Los estudios CoMFA se llevaron a cabo con el módulo QSAR del programa SYBYL 6.5¹⁴².

4.3.3. Modelo CoMFA generado para los derivados de 4*H*-piran-4-ona

El modelo CoMFA se generó empleando una serie de veintidós compuestos (serie de entrenamiento), recogidos en la Tabla 4.7. Con objeto de evaluar el poder predictivo del modelo CoMFA generado, el compuesto **14h** fue excluido arbitrariamente de la serie de entrenamiento y utilizado como compuesto de validación del modelo. Además, durante el proceso de validación cruzada (*cross-validation*) se eliminaron todos aquellos compuestos cuya desviación típica es superior al doble de la desviación típica del modelo. La citotoxicidad de los distintos compuestos en la línea celular tumoral seleccionada para el estudio CoMFA (H460, carcinoma de pulmón), se relacionó con las variables independientes (campos estérico y electrostático y energías de solvatación) mediante la metodología PLS.

Tabla 4.7. Valores de citotoxicidad (CI₅₀) experimentales y predichos por el modelo CoMFA de los compuestos utilizados en la serie de entrenamiento.

Compuesto	Estructura	CI ₅₀ ^{exp} (μM)	CI ₅₀ ^{pred} (μM)
8b		25	23
8c		25	24
8d		15	17

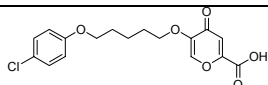
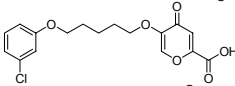
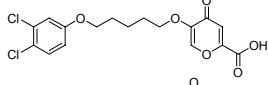
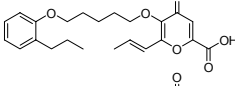
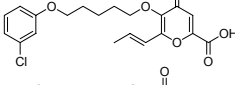
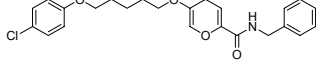
¹⁴¹ Véase la referencia 139.

¹⁴² SYBYL, Tripos Inc., 1699 South Handley Rd., St. Louis, MO63144.

Tabla 4.7, continuación. Valores de citotoxicidad (CI_{50}) experimentales y predichos por el modelo CoMFA de los compuestos utilizados en la serie de entrenamiento.

Compuesto	Estructura	CI_{50}^{exp} (μM)	CI_{50}^{pred} (μM)
8h		20	20
8j		25	24
8k		35	37
8l		20	20
8m		35	35
8n		15	15
8ñ		15	14
8p		40	38
8t		10	10
8u		10	11
8v		10	10
8w		10	11
8x		8,6	9,0
11a		6,3	7,0

Tabla 4.7, continuación. Valores de citotoxicidad (CI_{50}) experimentales y predichos por el modelo CoMFA de los compuestos utilizados en la serie de entrenamiento.

Compuesto	Estructura	CI_{50}^{exp} (μM)	CI_{50}^{pred} (μM)
14b		50	51
14c		50	51
14d		50	49
14f		50	50
14h		50	49 [#]
15		10	8,6

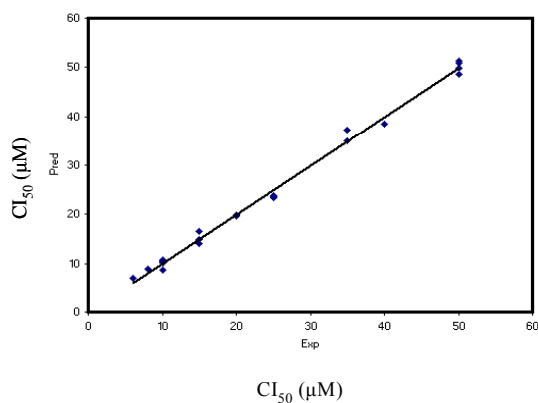
Compuestos de la serie 1 empleados en el estudio CoMFA junto a sus valores de citotoxicidad en la línea celular tumoral H460 experimentales (exp) y predichos (pred) por el modelo. El compuesto marcado con el símbolo [#] es el compuesto empleado en la validación.

En la Tabla 4.8 se muestran los parámetros estadísticos del análisis. El modelo CoMFA generado posee una buena capacidad predictiva, con un valor de q^2 (r^2_{cross} del análisis PLS mediante LOO, *leave-one-out*) elevado ($q^2 = 0,636$), por lo que constituye una herramienta útil para la predicción de la citotoxicidad en la línea celular tumoral de carcinoma de pulmón, H460. Además, el modelo no validado presenta un r^2 de 0,995 (ocho componentes principales). El campo estérico, el campo electrostático y la energía de solvatación contribuyen a la ecuación QSAR en un 39,9 %, 54,1 % y 6,0 %, respectivamente. Como prueba de la solidez del modelo CoMFA, éste se aplicó al compuesto excluido **14h** (que aparece marcado con el símbolo [#] en la Tabla 4.7). La comparación de los valores teóricos de citotoxicidad con los observados para la serie total de compuestos (Tabla 4.7) refleja la calidad del análisis, como se observa en la representación gráfica de la Figura 4.4.

Tabla 4.8. Parámetros estadísticos del modelo CoMFA generado para la línea celular H460.

q^2	0,636
SEP	11,688
n	22
N	8
r^2	0,995
SEE	1,413
F	313,646
p	<0,0001
Contribuciones:	
estérica	39,9 %
electrostática	54,1 %
solvatación (ΔG_{solv})	6,0 %

Parámetros estadísticos del modelo PLS generado usando los campos CoMFA (estéricos y electrostáticos) y ΔG_{solv} como variables independientes. El valor r^2_{cross} del análisis PLS mediante la validación cruzada (LOO) se indica como q^2 ; SEP denota el error estándar de la predicción; N es el número óptimo de componentes principales usado en el análisis PLS; n es el número de compuestos; r^2 es el coeficiente de correlación correspondiente al análisis PLS no validado; SEE representa el valor estándar en la estimación; se indica el valor estadístico F para el análisis PLS; p representa la probabilidad de equivocarse al rechazar la hipótesis de que r^2 sea 0; las contribuciones indican el porcentaje relativo de contribución de los campos estérico y electrostático o de ΔG_{solv} .

**Figura 4.4.**

Representación de los valores de citotoxicidad predichos por el modelo CoMFA generado para la línea celular tumoral H460 frente a los valores de citotoxicidad experimentales ($n = 22$, $r^2 = 0,995$).

Los resultados del análisis realizado se interpretan mejor mediante los mapas de contorno tridimensionales que visualizan las regiones del espacio alrededor de las moléculas en las que las interacciones de índole estérico o electrostático aumentan o disminuyen la citotoxicidad. El código de colores elegido ha sido el siguiente: a) mapa electrostático, el color rojo indica regiones en las que la presencia de densidad de carga electronegativa es favorable para la citotoxicidad mientras que el azul representa zonas en las que un sustituyente electronegativo es desfavorable; b) mapa estérico, las regiones en color verde representan zonas del espacio donde la presencia de un sustituyente voluminoso es favorable para la citotoxicidad mientras que la región amarilla indica regiones cuya ocupación resulta desfavorable.

El análisis CoMFA nos permite racionalizar los resultados de citotoxicidad observados en la línea tumoral H460. Así, estudiando en primer lugar la contribución electrostática, en estos modelos se deduce que en posición 2 (R^2) del anillo de piranona es necesario un sustituyente que tenga un grupo con alta electronegatividad (región roja) y uno de baja electronegatividad (zona azul). Como se observa en la Figura 4.5(a), el derivado **8d** ($R^2=CH_2OH$) verifica estas características, mientras que el derivado **14d** ($R^2=COOH$) no interacciona favorablemente con la región de color azul debido a la presencia del grupo carbonilo [Figura 4.5(b)]. Esto justifica la menor actividad citotóxica de la serie de los derivados carboxílicos frente a sus análogos hidroxílicos. Por otro lado, con respecto al anillo de benceno, en estos modelos se observa cómo sustituyentes electronegativos en las posiciones 3 y 4 resultan favorables para la interacción.

Con respecto a la contribución estérica, la característica más relevante es la presencia favorable de un sustituyente voluminoso en posición 2 del anillo de benceno [Figura 4.5(c), compuesto **8u**].

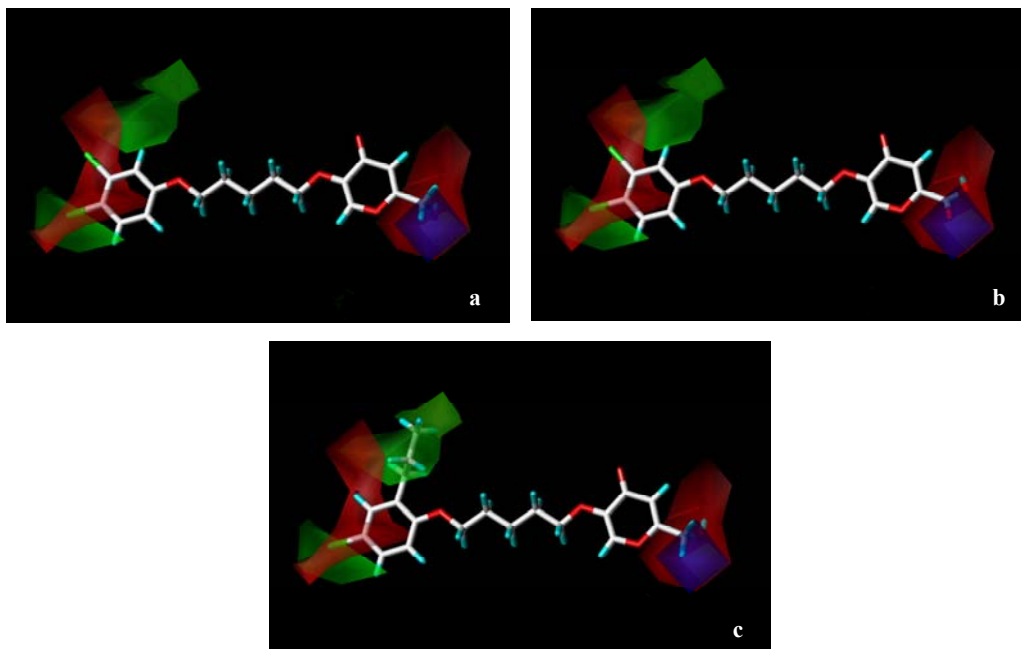
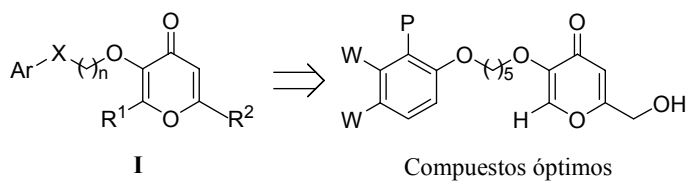


Figura 4.5a-c.

Mapas de contorno electrostático y estérico del modelo CoMFA con las estructuras (a) **8d**, Ar = 3,4-diclorofenilo, $R^2 = \text{CH}_2\text{OH}$; (b) **14d**, Ar = 3,4-diclorofenilo, $R^2 = \text{COOH}$; y (c) **8u**, Ar = 2-propil-4-clorofenilo, $R^2 = \text{CH}_2\text{OH}$, como referencia. Los colores amarillo y verde representan el campo estérico; el color amarillo indica regiones cuya ocupación resulta perjudicial para la citotoxicidad, mientras que las regiones verdes representan zonas en las que la presencia de un sustituyente voluminoso es favorable para la citotoxicidad. Los colores rojo y azul componen el mapa de contorno electrostático; el color rojo indica las regiones en las que la presencia de densidad de carga negativa favorece la citotoxicidad, mientras que el azul representa las regiones en las que una densidad de carga negativa va en detrimento de la citotoxicidad.

Así, a partir de los mapas de contorno estérico y electrostático del modelo CoMFA generado para los derivados de 4*H*-piran-4-ona, se puede predecir que los compuestos de estructura general **I** con mayor citotoxicidad serían aquellos que presenten sustituyentes con carácter electronegativo y poco voluminosos en las posiciones 3 y 4, junto con un sustituyente poco o nada electronegativo y relativamente voluminoso (como por ejemplo un grupo alquilo) en la posición 2 del anillo bencénico. Con respecto al sistema de piranona, la situación más favorable se obtendría con un átomo de hidrógeno en la posición R¹ y un grupo hidroximetilo en la posición R² (Esquema 4.20).

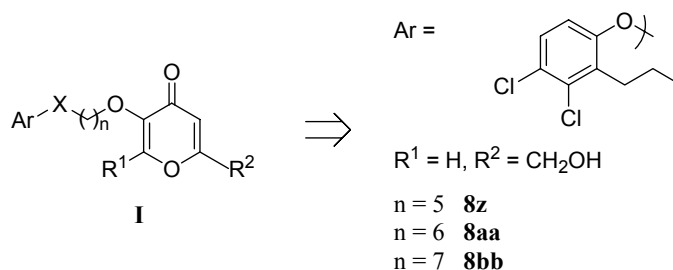


donde: W = átomo electronegativo poco voluminoso.
 P = cadena alifática.

Esquema 4.20.

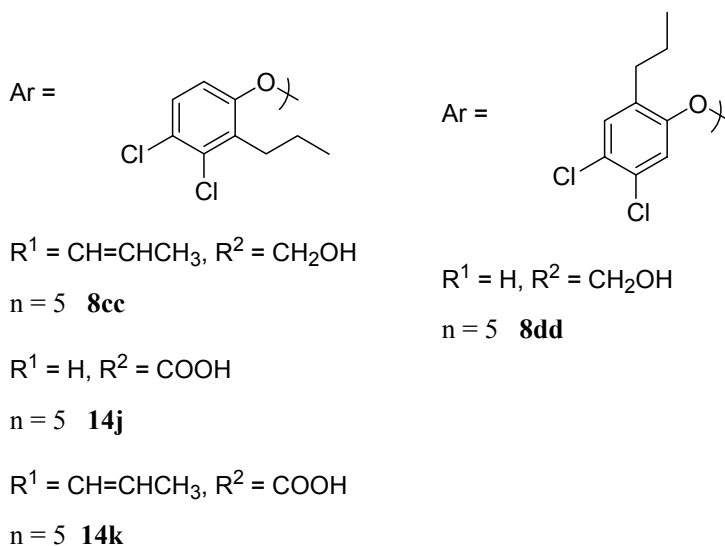
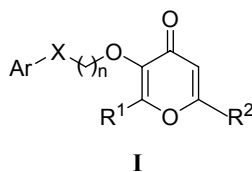
4.4. VALIDACIÓN DEL MODELO CoMFA MEDIANTE EL DISEÑO Y LA SÍNTESIS DE NUEVOS COMPUESTOS

Teniendo en cuenta las predicciones del modelo CoMFA se ha llevado a cabo la síntesis de diversas hidroximetil-4*H*-piran-4-onas que cumplan los requisitos estructurales óptimos determinados por el estudio QSAR-3D. Dentro de este grupo se ha considerado como subunidad aromática un anillo bencénico con dos sustituyentes cloro en posiciones 3 y 4 (W = Cl) y un grupo propilo en posición 2, y con $R^1 = H$ y $R^2 = CH_2OH$ como sustituyentes de la piranona. Además, dentro de la estructura general **I**, se llevó a cabo la variación de la longitud del espaciador entre 5 y 7 eslabones metilénicos (**8z**, **8aa** y **8bb**), con objeto de observar la influencia de este efecto en las características biológicas de los compuestos (Esquema 4.21).



Esquema 4.21.

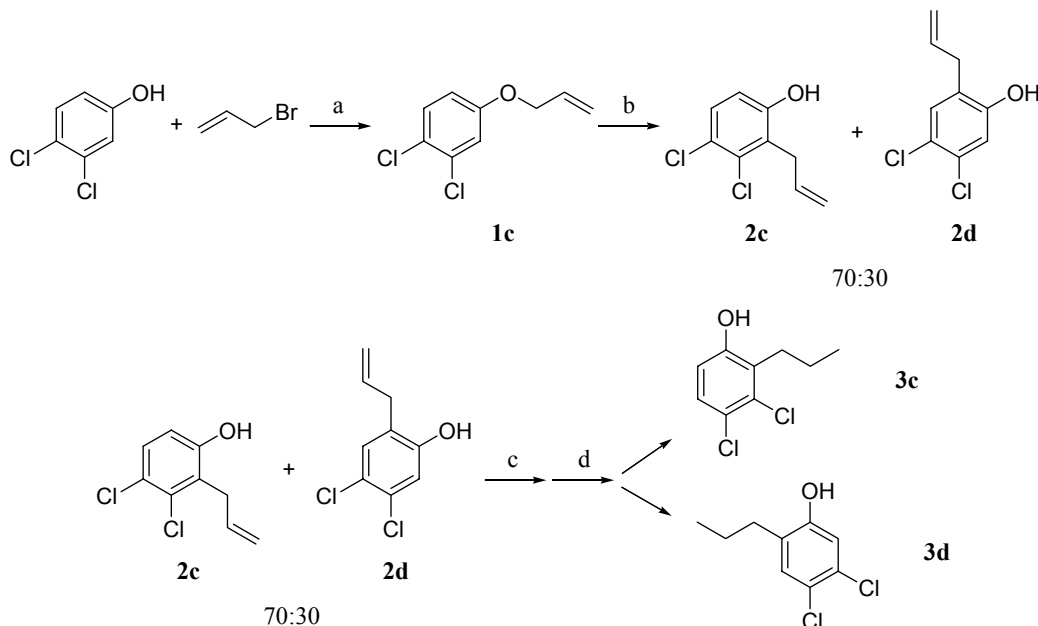
Por otro lado, se han sintetizado los compuestos **8cc**, **8dd**, **14j** y **14k** (Esquema 4.22), los cuales no cumplen los requisitos estructurales óptimos predichos, con el fin de comprobar la eficacia predictiva del modelo CoMFA.

**Esquema 4.22.**

La síntesis de las (hidroximetil)-4*H*-piran-4-onas **8z-dd** se realizó siguiendo el método A descrito en el apartado 4.1.1, a partir de ácido kójico o ácido 2-propenilkójico **6**, y los aril bromoalquil éteres correspondientes, **4j-m**.

Los aril bromoalquil éteres se han obtenido a través de una secuencia sintética cuya etapa clave es la transposición de Claisen de un alil aril éter. Por tratamiento del 3,4-diclorofenol comercial, con bromuro de alilo en medio básico, se obtiene el éter aromático **1c**, que se somete a continuación a un calentamiento a 180° C durante 4 horas, en un baño de grafito. Esta reacción conduce a una mezcla de los 2-alilfenoles **2c,d** en proporción 70:30. Debido a la dificultad de separación de estos dos productos, su mezcla se hidrogenó utilizando níquel-

Raney como catalizador, para obtener así los 2-propilfenoles **3c,d**, que se separan por cromatografía en columna¹⁴³ (Esquema 4.23).



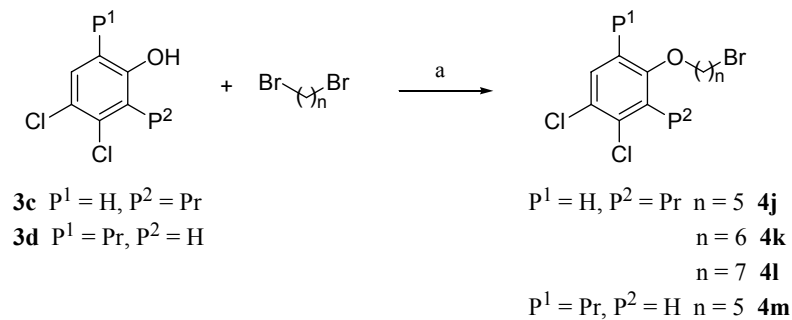
Condiciones de reacción: a) K_2CO_3 , NaI, 2-butanona, 24 h, reflujo; b) $180^\circ C$, Ar, 4 h; c) H_2 , Ni-Raney, etanol:tolueno, 5 h, temperatura ambiente; d) separación por cromatografía.

Esquema 4.23.

Aunque los resultados del estudio QSAR-3D inicialmente apuntaban hacia la subunidad aromática con todos los sustituyentes a un lado del anillo aromático (3,4-dicloro-2-propilfenol, **3c**); sin embargo, la disponibilidad de una pequeña cantidad del regioisómero generado en la transposición de Claisen (4,5-dicloro-2-propilfenol, **3d**) hizo que también se considerase su reacción con la piranona, con el fin de validar el resultado de dicho estudio.

¹⁴³ Dow. Chem. Co. US 2901515. [Chem. Abst. 1428, **1960**]

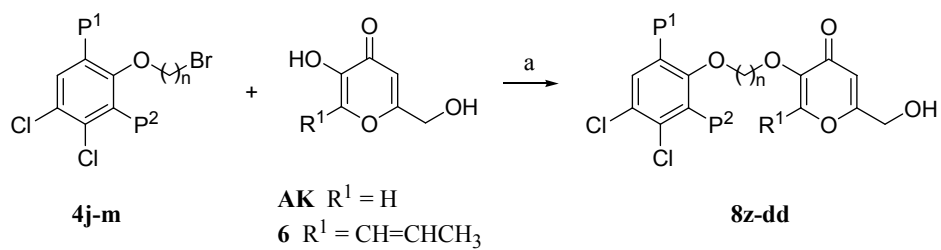
Así, tanto el fenol **3c** como el **3d** se transformaron en sus correspondientes bromoalquilfenoles, **4j-m**, empleando las condiciones de alquilación estándar (Esquema 4.24).



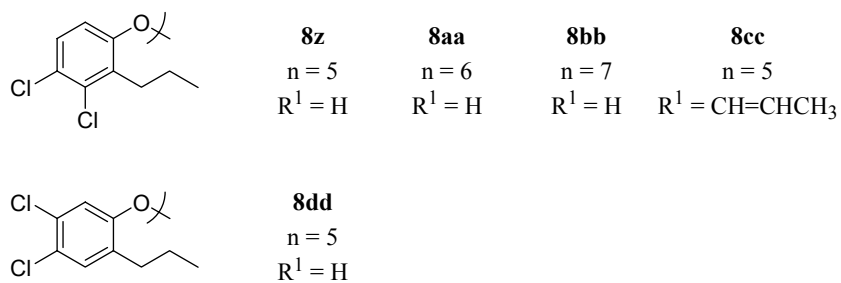
Condiciones de reacción: a) K_2CO_3 , NaI, 2-butanona, 48 h, reflujo.

Esquema 4.24.

La posterior alquilación de estos derivados bromados, **4j-m**, con ácido kójico o con ácido 2-propenilkójico **6**, condujo a un nuevo grupo de hidroximetil-4*H*-piran-4-onas (Esquema 4.25) con buenos rendimientos, que se sometieron a la evaluación de su citotoxicidad.

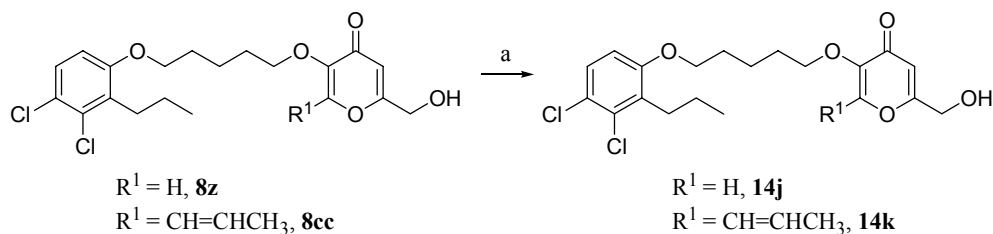


Condiciones de reacción: a) K_2CO_3 , NaI, DMF, 48 h, 50° C.



Esquema 4.25.

A continuación, los ácidos **14j,k** (Esquema 4.26) se sintetizaron a partir de los alcoholes correspondientes **8z** y **8cc**, mediante la oxidación con reactivo de Jones.



Condiciones de reacción: a) reactivo de Jones ($CrO_3 / H_2SO_4 \cdot H_2O$), acetona, 2-3 horas, desde $0^\circ C$ hasta temperatura ambiente.

Esquema 4.26.

La citotoxicidad de estos compuestos en la línea celular H460 se muestra en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Valores de citotoxicidad (CI_{50}) experimentales en la línea celular tumoral H460 de los compuestos **8z-8dd**, **14j** y **14k**.

Compuesto	Estructura	CI_{50} (μM)
8z		15
8aa		7,0
8bb		9,8
8cc		15
8dd		5,0
14j		>50
14k		>50

Como se observa en la Tabla 4.9, los valores de citotoxicidad de los compuestos **8z-8dd** son relativamente parecidos, por lo que no parece que la variación del espaciador metilénico entre 5 y 7 eslabones ejerza una gran influencia en la citotoxicidad. Este hecho podría indicar que la cadena alquílica que separa el anillo aromático y el de piranona está ligeramente plegada, permitiendo que las moléculas adopten una conformación bioactiva en horquilla. Asimismo, el análisis de la citotoxicidad de los compuestos **14j,k** permitió verificar que la presencia de un grupo ácido (R^2) en el anillo de piranona ejerce un efecto negativo en dicha actividad.

Los compuestos con cinco unidades metilénicas en el espaciador, **8z**, **8cc** y **14k**, se han empleado en la validación del modelo CoMFA. En la Tabla 4.10 se ve que los valores de CI_{50} predichos están de acuerdo con los valores experimentales.

Tabla 4.10. Validación del modelo CoMFA. Valores de citotoxicidad (CI_{50}) experimentales y predichos de los compuestos **8z**, **8cc** y **14k**.

Compuesto	CI_{50}^{exp} (μM)	CI_{50}^{pred} (μM)
8z	15	12
8cc	15	19
14k	>50	45

Adicionalmente, se estudió el crecimiento independiente de matriz y la influencia en la migración celular de los compuestos **8z-8dd**. Los resultados están recogidos en la Tabla 4.11. Puede observarse cómo **8z** muestra una alta capacidad tanto para inhibir el crecimiento independiente de matriz como para frenar la migración tumoral, factor de extrema importancia dada su relación con los procesos de metástasis, lo cual supone una notable mejora con respecto a los compuestos anteriores de la serie 1, ya que ninguno fue capaz de alterar este proceso. De nuevo se comprobó que **8z** ejerce su actividad antitumoral mediante acción directa en la proteína Ras.

Tabla 4.11. Influencia sobre el crecimiento independiente de matriz (CIM) y migración celular de los compuestos óptimos.

Compuesto	CIM (CI ₅₀ , µM)		Migración
	matrigel	agar	
8z	<<1	3	Inhibición
8aa	NE	NE	NE
8bb	7,5	NE	Inhibición
8dd	ND	ND	Inhibición

ND significa no determinado y NE que no hay efecto.

Estos resultados, junto con la elevada capacidad citotóxica que este compuesto muestra en las líneas tumorales HCT116 y MDA231, su selectividad frente a las células no tumorales MCF10A (CI₅₀ > 50 µM), así como su capacidad para inhibir el desarrollo del citoesqueleto y la actividad metaloproteínasa de las células tumorales, hacen de **8z (EHT0229)** el candidato idóneo para comenzar los primeros ensayos *in vivo* dirigidos a evaluar su biotoxicidad así como su eficacia antitumoral.

Tabla 4.12. Resultados de los ensayos *in vitro* del compuesto **8z (EHT0229)**.

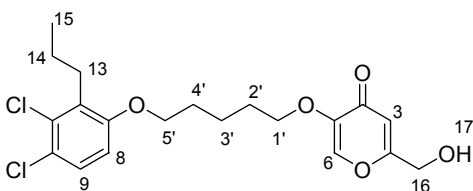
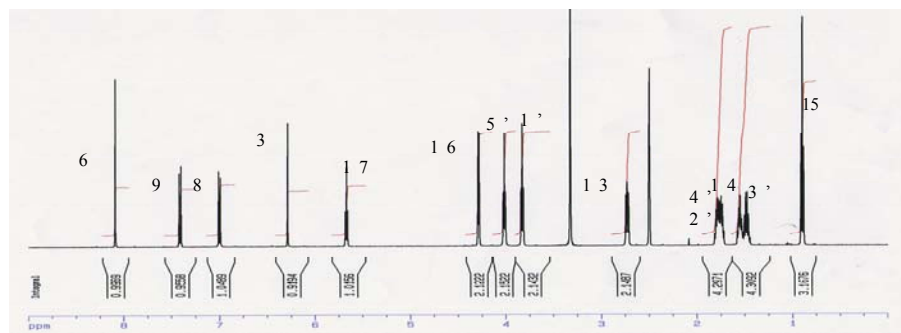
Citotoxicidad (µM)				CIM		Migración	Desarrollo de citoesqueleto	Actividad metaloproteínasa	Células transfectadas con RasVal12
H460	HCT116	MDA231	MCF10A	matrigel	agar				
15	10	25	> 50	<< 1	3	Inhibición	Inhibición	Inhibición	+

En la Tabla 4.12 están recogidos los datos más representativos del compuesto **8z (EHT0229)**.

4.5. CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO COMPUESTO **8z (EHT0229)**-PROTEÍNA RAS MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y SIMULACIÓN MOLECULAR

Paralelamente a los ensayos biológicos, en nuestro grupo de investigación, y con objeto de estudiar el modelo de unión del compuesto **8z (EHT0229)** con la proteína Ras, se realizaron estudios de diferencia de transferencia de saturación (STD, *saturation transfer difference*), utilizando una disolución de una mezcla de **8z (EHT0229)** y proteína Ras constitutivamente activada. Además, mediante simulación de dinámica molecular se ha estudiado la interacción entre el compuesto **8z (EHT0229)** y la proteína Ras.

En primer lugar, se llevaron a cabo varios experimentos de RMN del compuesto **8z (EHT0229)** en ausencia de proteína con el fin de asignar cada una de sus señales (Figuras 4.6-4.8); a continuación, se añadió la proteína RasVal12 al tubo de resonancia y se realizaron los experimentos de STD.

**8z (EHT0229)****Figura 4.6.**

^1H -RMN (500 MHz) de **8z** en DMSO-d_6 .

Al observar los experimentos de ^1H , ^{13}C , HMQC, HMBC y NOESY del compuesto **8z** (**EHT0229**) en disolución se comprueba que, al igual que en los compuestos estudiados anteriormente (**8r** y **14b**), la conformación mayoritaria, y por tanto la más estable, es extendida, con la cadena alquílica espaciadora en zig-zag. Mediante los experimentos HMQC y HMBC se pueden asignar inequívocamente los protones $\text{H}^{1'}$ / $\text{H}^{5'}$ y H^8 / H^9 , y se pueden conocer, al menos cualitativamente, las constantes de acoplamiento $^nJ_{\text{C-H}}$ (Figura 4.7).

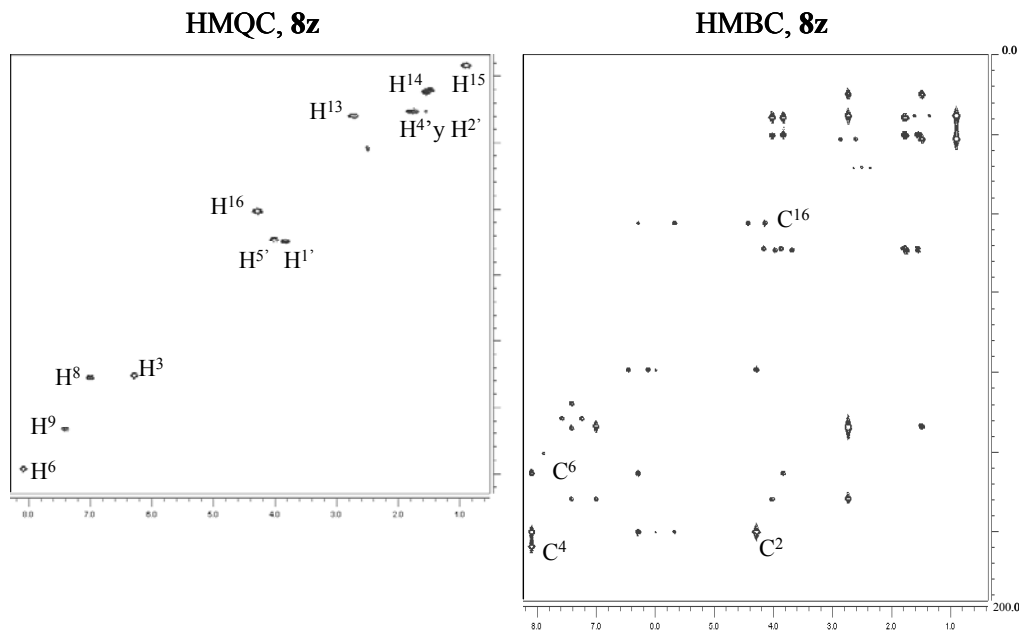


Figura 4.7.

Espectros HMQC y HMBC (90 ms) del compuesto **8z** (EHT0229) en DMSO- d_6 :D $_2$ O (~1:1).

En el experimento NOESY con un tiempo de mezcla de 900 ms de **8z** (EHT0229) se pueden observar los picos de cruce entre los protones más próximos en el espacio (Figura 4.8). En dicho espectro se observan señales entre cada anillo aromático y la cadena espaciadora, que indican que tanto el hidrógeno de la posición R¹ (H⁶) del anillo de piranona (picos de cruce entre H⁶ y H^{1'} y H⁶ y H^{2'}/H^{4'}), como el H⁸ del anillo bencénico (H⁸ y H^{5'} y H⁸ y H^{2'}/H^{4'}), se encuentran próximos a la cadena alquílica espaciadora. Por otro lado, se ven picos de cruce de intensidades moderadas entre H¹³ y H^{5'} y H¹⁵ y H^{2'}/H^{4'}, y débiles entre H¹⁵ y H^{5'} y H¹⁵ y H^{1'}, que indican que el grupo propilo en posición *orto* del anillo bencénico se encuentra orientado hacia la cadena espaciadora. Finalmente, y como cabría esperar, se puede ver que el grupo hidroximetilo de la posición R² del anillo de piranona está cerca de H³ (picos de cruce débiles entre H³ y H¹⁶ y H³ y H¹⁷).

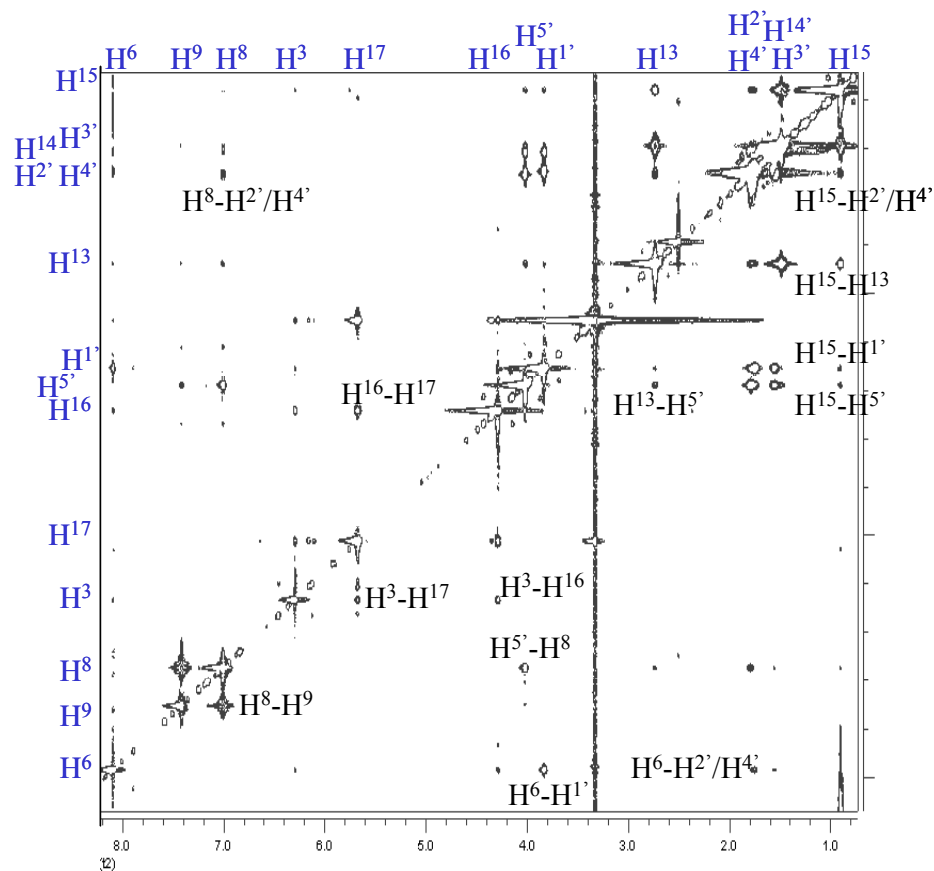


Figura 4.8.

NOESY de **8z** (EHT0229) (900 ms) en DMSO- d_6 .

El estudio de la interacción ligando-proteína haciendo un seguimiento de las señales de RMN de los ligandos se basa en estudios de NOE¹⁴⁴ y NOE-transferido¹⁴⁵. Cuando un ligando pasa del estado libre en disolución al estado asociado a un receptor proteico se produce en sus señales un cambio en el signo del NOE (tr-NOE)¹⁴⁶. Las moléculas de mediano o pequeño peso molecular ($\approx 1000\text{-}2000\text{ g/mol}^{-1}$) presentan tiempos de correlación (τ_c) pequeños, lo que hace que, en función de su tamaño, forma e intensidad de campo magnético, presenten efectos NOE positivos, efecto NOE casi cero, o incluso, efectos NOE débilmente negativos. Las moléculas de gran tamaño, sin embargo, muestran siempre valores fuertemente negativos de NOE. Esta diferencia hace que al producirse la unión de un ligando (molécula pequeña) con otra de gran tamaño (proteína), el ligando adopte el comportamiento de la macromolécula, adquiriendo así un valor fuertemente negativo de NOE. Este efecto debido al intercambio entre los estados libre y asociado se denomina efecto Overhauser nuclear transferido (tr-NOE), y puede ser tanto intramolecular como intermolecular¹⁴⁷.

El tr-NOE intramolecular sirve para determinar la estructura tridimensional de ligandos en el sitio de reconocimiento de sus receptores y los cambios conformacionales existentes respecto a la conformación en estado libre¹⁴⁸. Actualmente pueden interpretarse los valores de tr-NOE cuantitativamente, de forma que la información acerca de la unión entre un ligando y su proteína es cada vez mayor¹⁴⁹. Así, el empleo de tr-NOE intramolecular no sólo permite determinar si existe o no asociación de un ligando con una proteína sino, además,

¹⁴⁴ Véase la referencia 99.

¹⁴⁵ (a) Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Dadok, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 4015. (b) Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Breslow, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 4017. (c) Albrand, J. P.; Birdsall, B.; Feeney, J.; Roberts, G. C. K.; Burgen, A. S. V., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1979**, *1*, 37. (d) Clore, G. M.; Gronenborn, A., *J. Magn. Reson.*, **1983**, *53*, 423. (e) Feeney, J.; Birdsall, B.; Roberts, G. C.; Burgen, A. S., *Biochemistry*, **1983**, *22*, 628.

¹⁴⁶ (a) Krishna, N. R.; Moseley, H. N. B., en *Structural Computation and Dynamics in Protein NMR*, Vol. 17, Eds. Krishna, N. R. y Berliner, L. J., Kluwer Academic, New York, **1999**, pp. 223. (b) London, R. E., *J. Magn. Reson.*, **1999**, *141*, 301. (c) Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Canada, F. J.; Poveda, A., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, *9*, 549. (d) Peters, T.; Pinto, B. M., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1996**, *6*, 710. (e) Ni, F., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1994**, *26*, 517.

¹⁴⁷ (a) Li, D.; Levy, L. A.; Gabel, S. A.; Lebetkin, M. S.; DeRose, E. F.; Wall, M. J.; Howell, E. E.; London, R. E., *Biochemistry*, **2001**, *40*, 4242. (b) Moseley, H. N.; Lee, W.; Arrowsmith, C. H.; Krishna, N. R., *Biochemistry*, **1997**, *36*, 5293.

¹⁴⁸ Poveda, A.; Jiménez-Barbero, J., *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, *27*, 133.

¹⁴⁹ Véanse las referencias 146a, b y e.

identificar la estructura 3D de éste en el sitio activo del receptor. Por tanto, permite determinar cuál de sus conformaciones en disolución es reconocida por un determinado receptor (conformación bioactiva). El conocimiento de la conformación bioactiva de los ligandos mediante este método supone un gran avance para el desarrollo racional de nuevos fármacos.

Por otro lado, los experimentos de tr-NOE intermolecular (STD) consisten en la aplicación de una radiofrecuencia selectiva de baja potencia a algunos protones de la proteína en regiones en las que no haya señales del ligando. En las macromoléculas la transferencia de magnetización es muy eficiente, lo que permite que la radiofrecuencia aplicada se expanda rápidamente a lo largo de éstas, llegando hasta los sitios de reconocimiento de los ligandos. Así, si se perturban también las intensidades de algunas señales del ligando, significará que esas zonas perturbadas del ligando están muy próximas al receptor, pudiendo determinarse así su epítipo¹⁵⁰.

Para detectar de manera sencilla las variaciones de intensidad de los ligandos se realizan experimentos de STD en muestras que contengan exceso de ligando(s) frente a la proteína. Primero se realiza un experimento en el que se saturan, de manera selectiva, algunos protones de la proteína en zonas en las que no haya señales de ligando(s). A continuación, se aplica la saturación en una región en la que no estén presentes protones ni del ligando ni de la proteína. Finalmente, se procede a la resta de los dos espectros obtenidos (STD), que proporciona un tercer espectro en el que se observan únicamente las señales del ligando(s) que interaccionan con la proteína. En la actualidad, esta técnica es muy útil en el cribado de ligandos con aplicación terapéutica.

Así, al añadir proteína RasVal12 al tubo de resonancia que contiene **8z (EHT0229)** en disolución se puede observar un ligero ensanchamiento de las señales de RMN, lo que indica que existe interacción entre la macromolécula y el ligando; es decir, que se produce la unión entre ellos (Figura 4.9).

¹⁵⁰ Mayer, M.; Meyer, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 6108.

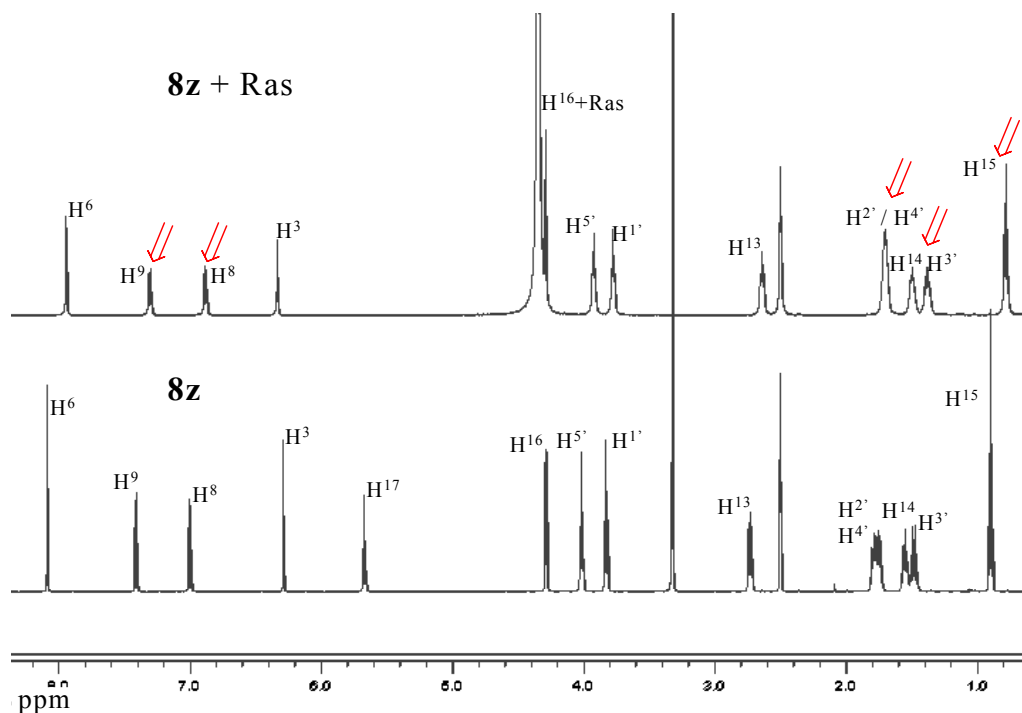


Figura 4.9.

Espectros de protón de **8z** (**EHT0229**) en estado libre (DMSO- d_6) y asociado con la proteína Ras-Val12 en una mezcla de disolventes deuterados D_2O y DMSO- d_6 1:1 aproximadamente. Con una flecha roja se indican las señales que más varían de un estado a otro.

En nuestro caso, el experimento STD permitió determinar qué zonas del ligando **8z** (**EHT0229**) son las que más interaccionan con la proteína Ras. El metilo (H^{15}) del grupo propilo que se encuentra en la posición *orto* del anillo bencénico es el que adquiere una mayor transferencia de saturación, lo que indica que es la parte de la molécula que más interacciona con Ras. Además, se encuentran señales con una gran interacción con la proteína como H^9 y H^8 del anillo aromático y $H^{2'}/H^{4'}$ y $H^{3'}$ de la cadena alquílica espaciadora. En menor proporción, también existe transferencia de saturación a los protones del anillo de piranona, H^3 y H^6 , y al metileno del grupo propilo del anillo aromático H^{14} , que son, por tanto, los que quedarían relativamente más alejados de la proteína (Figura 4.10).

Por otro lado, el experimento tr-NOESY de **8z** (**EHT0229**) en presencia de Ras muestra picos de cruce negativos, en contraste con el experimento NOESY realizado en el estado libre. Por tanto, contiene información conformacional sobre el estado asociado.

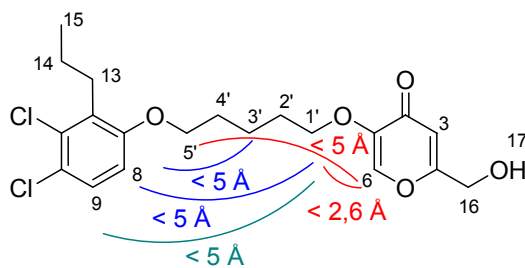
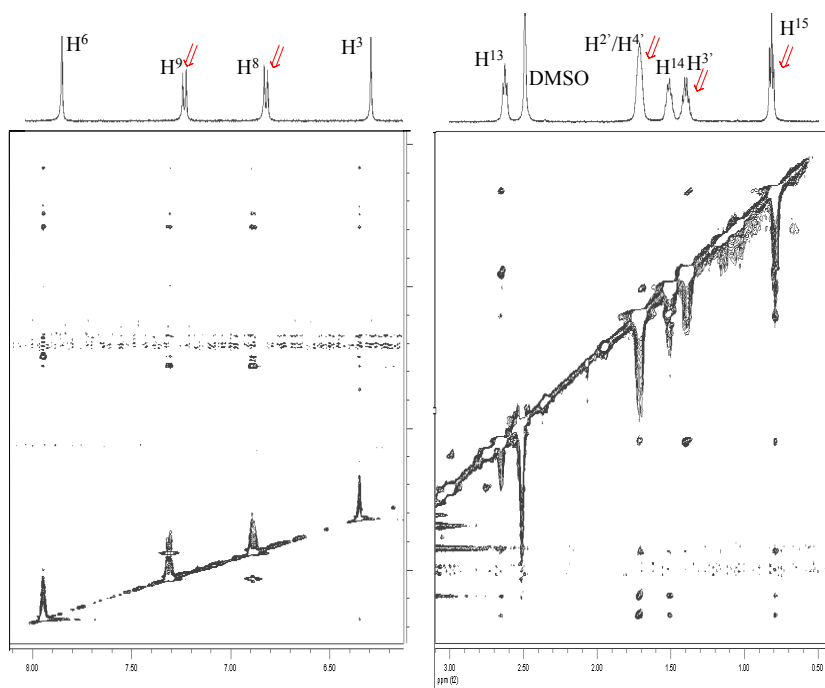


Figura 4.10.

Espectro tr-NOESY de **8z** (**EHT0229**)+Ras-Val12.

En la Figura 4.10 y en la Tabla 4.13 se representan las distancias cuyos picos de cruce presentan una mayor variación de intensidad en el estado asociado (Figura 4.10) con respecto al estado libre (Figura 4.8). Dichas distancias se han determinado de forma aproximada empleando la ecuación [4.2] (véase el apartado 4.3.1). Cabe resaltar que estos picos indican que la conformación bioactiva ha de estar ligeramente plegada, de manera que tanto los hidrógenos del anillo aromático, H⁸ y H⁹, como el hidrógeno en la posición seis del anillo de piranona (H⁶) se encuentren cerca de los metilenos más alejados H^{1'} y H^{5'}, respectivamente.

Tabla 4.13. Distancias representativas de la conformación bioactiva de **8z** (**EHT0229**)+Ras-Val12.

	H ⁸	H ⁹	H ⁶
CH ₂ ^{1'}	< 5 Å	< 5 Å	< 2,6 Å
CH ₂ ^{5'}	--	--	< 5 Å
CH ₂ ^{3'}	< 5 Å	< 5 Å	< 5 Å

Estos datos justifican la similitud de los valores de citotoxicidad observados en los compuestos con espaciadores metilénicos de longitud variable (**8z**, **8aa**, **8bb**; véase la Tabla 4.9), debido a la conformación plegada que adoptan dichos compuestos al interactuar con la proteína Ras.

Teniendo en cuenta los resultados del experimento de STD y los datos cristalográficos de Ras-GTP¹⁵¹ se ha realizado un estudio de simulación computacional del complejo **8z** (**EHT0229**) con la proteína Ras.

Las simulaciones de la interacción entre la proteína Ras (PDB 5p21) y el ligando **8z** (**EHT0229**) se han llevado a cabo dentro de una caja (~70x70x70 Å) formada por ~7000 moléculas de agua TIP3P. El protocolo de simulación consistió en la utilización de un colectivo NPT con condiciones periódicas de contorno y sumas de Ewald para evaluar las interacciones electrostáticas. Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el

¹⁵¹ Véase la referencia 102b.

programa AMBER7. Los parámetros para el sistema se obtuvieron del campo de fuerzas de Cornell *et al*¹⁵² y del “*general Amber force field*”, usando cargas puntuales tipo RESP.

Como se ha descrito en el apartado 3.3, la proteína Ras está formada por estructuras de tipo α - β . Los bucles que conectan las hojas β forman un bolsillo en el que se aloja la molécula de GTP necesaria para la activación de Ras (Figura 4.11 a,b).

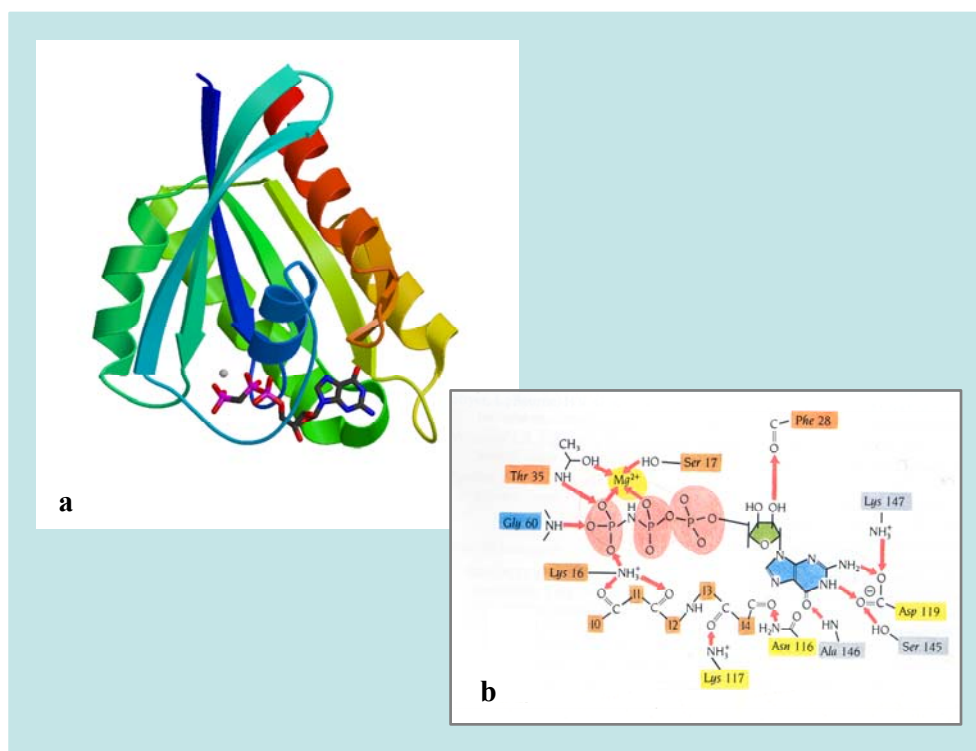


Figura 4.11 a,b.

Complejo proteína Ras-GTP. (a) Visión global del complejo; (b) ampliación de la molécula de GTP.

¹⁵² Cornell W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M. Jr.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5179.

El anillo de guanina de GTP se une a Ras mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos NH y NH₂ y el Asp¹¹⁹, aminoácido que se encuentra totalmente conservado en las proteínas Ras, y el N y la Asn¹¹⁶. Además, el oxígeno del anillo de ribosa forma un enlace de hidrógeno con la cadena lateral de la Lys¹¹⁷, mientras que los hidroxilos interaccionan con el carbonilo de la Phe²⁸ (Figura 4.12b). Por otra parte, los fosfatos terminales son esenciales para la unión con Ras mediante interacciones polares con la Lys¹⁶ y un catión Mg²⁺, que a su vez está unido a las cadenas laterales de la Ser¹⁷ y la Thr³⁵ (Figuras 4.11b y 4.12a).

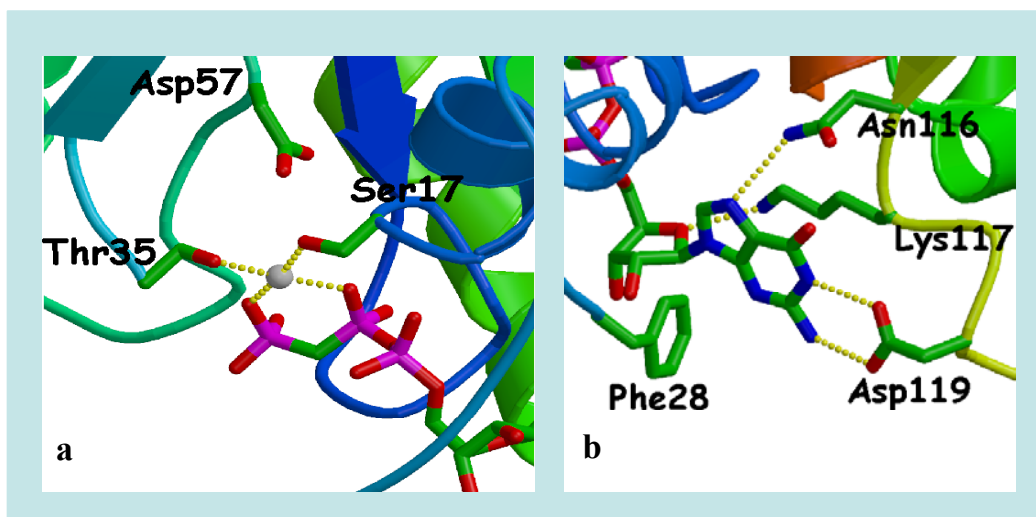


Figura 4.12 a,b.

Complejo proteína Ras-GTP. (a) Ampliación de las interacciones de los grupos fosfato con la proteína Ras; (b) ampliación de las interacciones de los anillos de guanina y ribosa con Ras.

Para llevar a cabo el modelo de interacción del compuesto **8z (EHT0229)** con la proteína Ras se ha considerado que la inhibición de la actividad de Ras se produce mediante la ocupación del sitio de unión del GTP por el ligando. A partir de la conformación bioactiva de **8z (EHT0229)** obtenida por RMN se ha ido mimetizando la molécula de GTP. Así, el grupo hidroximetilo del anillo de piranona mimetiza al anillo de guanina en su interacción con el Asp¹¹⁹ y cuenta con la formación de un enlace de hidrógeno adicional con la Lys¹⁴⁷, confirmandose la importancia de un grupo con carácter dador-aceptor en esta zona de la molécula. El grupo carbonilo de la piranona reproduce la unión del nitrógeno sp² de la guanina con la Asn¹¹⁶. El grupo éter de la cadena espaciadora unido al anillo de piranona forma un enlace de hidrógeno con la cadena lateral de la Lys¹¹⁷, mimetizando la unión del anillo de furanosa de GTP. Además, se observa una interacción aromática-aromática en forma de T entre la Phe²⁸ y el anillo de piranona (Figura 4.13b). En lo que respecta al otro extremo del ligando **8z (EHT0229)**, los átomos de cloro son responsables de la interacción con el Mg²⁺ y la Gln⁶¹, de manera análoga a los grupos fosfato de GTP (Figura 4.13a). Este tipo de interacción entre átomos de halógeno y el ión magnesio(II) se ha observado con anterioridad en la bibliografía¹⁵³. Además, el anillo aromático forma a su vez una interacción aromática-aromática en forma de T con la cadena lateral de la Tyr³²; y, finalmente, el metilo de la cadena de propilo se sitúa en el bucle formado por la Gly¹³, la Val¹⁴ y la Gly¹⁵ (Figura 4.13a).

¹⁵³ Braig, K.; Menz, R. I.; Montgomery, M. G. Leslie, A. G.; Walker, J. E., *Structure*, **2000**, 8, 567.

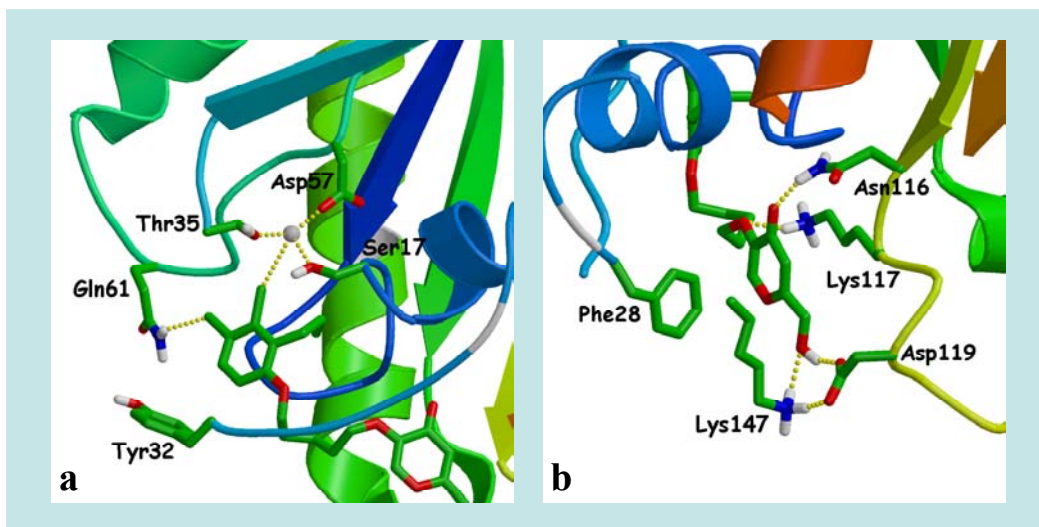


Figura 4.13 a,b.

Complejo proteína **Ras-8z (EHT0229)**. (a) Ampliación de la zona de interacción del anillo bencénico; (b) ampliación de la región de la piranona.

Estas interacciones justifican los resultados obtenidos mediante el experimento tr-NOESY, que muestra una fuerte transferencia de NOE de la proteína al metilo de la cadena lateral del anillo aromático y a los hidrógenos H⁸ y H⁹ del mismo anillo, así como al hidrógeno en posición seis del anillo aromático (H⁶).

Este modelo de interacción servirá como punto de partida para poder dirigir el desarrollo de nuevos inhibidores de la proteína Ras.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión se han determinado en un aparato Stuart-Scientific. Los espectros de IR se han registrado en un espectrómetro “Perkin-Elmer 781”, las frecuencias se expresan en cm^{-1} . Los espectros de ^1H - y ^{13}C - RMN se han obtenido en los espectrómetros “Varian VXR-300S”, “Bruker Avance DPX-300” a 300 y 75 MHz y “Bruker AC-200” a 200 y 50 Mz, del Centro de Asistencia a la Investigación de RMN de la UCM (Facultad de Ciencias Químicas). Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano como referencia interna; las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en hertzios (Hz). En la descripción de las señales de RMN se han empleado las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), sx (sextuplete), m (multiplete), a (ancho), ap (aparente). Los análisis elementales cuantitativos (C, H, N) de los compuestos finales se han determinado en el Centro de Asistencia a la Investigación de Análisis de la UCM (Facultad de Farmacia), con un error de $\pm 0,4 \%$ respecto de los valores teóricos. La espectrometría de masas se llevó a cabo por inyección directa en un instrumento “HP 5989”, usando la técnica de impacto electrónico con una energía de 70 eV, o por ionización suave, electro-spray, con un “ESQUIRE~LC” de Bruker. Los picos se expresan en m/z , y los picos molecular, molecular menos una unidad, molecular más una unidad, molecular más sodio y pico base se indican como (M), (M-1) (M+1), (M+Na) y (100) respectivamente. La cromatografía analítica en capa fina (c.c.f.) se ha llevado a cabo en cromatofolios de gel de sílice de Merck (Kieselgel 60F-254) y detección con luz UV o disolución etanólica al 10% de ácido fosfomolibdico (PMA). Para las cromatografías en columna se ha empleado gel de sílice tipo 60 de Merck (tamaño de grano 70-230 y 230-400 ASTM). La cromatografía líquida de alta resolución (H.P.L.C.) se realizó en una columna SUPELCOSILTM LC-18, 15 cm x 4 (tamaño de partícula, 5 μm) en acetonitrilo:agua (98:2, v:v); el flujo empleado fue de 1mL: min. y el volumen inyectado de 20 μL . Todos los productos de partida y reactivos se han adquirido con alto grado de pureza en Aldrich, Fluka, Merck, Panreac ó Lancaster. Los disolventes con alto grado de pureza se adquirieron en

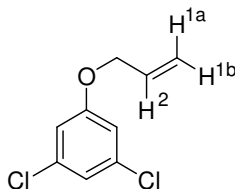
SDS, Panreac o Merck. Todos los demás disolventes se han secado y/o destilado antes de ser utilizados.

5.1. SÍNTESIS DE LOS 2-ALILFENOLES **2a-d** Y DE LOS 2-PROPILFENOLES **3a-d**

5.1.1. Procedimiento general de síntesis de los alil aril éteres **1a-c**

Sobre una suspensión de 1 eq. (60-62 mmol) del correspondiente clorofenol, 1 eq. de carbonato potásico anhidro y 0,1 eq. de yoduro potásico en 60 mL de 2-butanona, se añaden gota a gota 1,1 eq. de bromuro de alilo. La mezcla se refluje durante 24 horas y después de enfriar se filtra a vacío y se evapora hasta sequedad. El aceite resultante se disuelve en éter etílico (40 mL) y se lava con agua (2x30 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂CO₃, se filtra y el disolvente se elimina a vacío hasta conseguir un aceite amarillo.

5.1.1.1. Alil 3,5-diclorofenil éter, **1a**¹⁵⁴

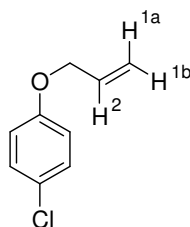


Rendimiento: 95 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 4,53 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, CH₂O), 5,31-5,45 (m, 2H, H^{1a}, H^{1b}), 5,98-6,03 (m, 1H, H²), 6,82 (s, 2H, HAr), 6,97 (s, 1H, HAr).

¹⁵⁴ Véase la referencia 119a.

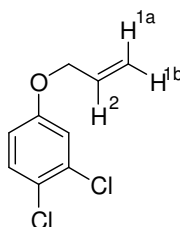
5.1.1.2. Alil 4-clorofenil éter, **1b**¹⁵⁵



Rendimiento: 78 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 4,43 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H, CH₂O), 5,18-5,38 (m, 2H, H^{1a}, H^{1b}), 5,86-6,05 (m, 1H, H²), 6,74 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, HAr), 7,13 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, HAr).

5.1.1.3. Alil 3,4-Diclorofenil éter, **1c**¹⁵⁶



Rendimiento: 87 %.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 4,40 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, CH₂O), 5,29 (dd, $J = 10,5$; 1,2 Hz, 1H, H^{1b}), 5,38 (dd, $J = 17,4$; 1,5 Hz, 1H, H^{1a}), 5,95-6,04 (m, 1H, H²), 6,75 (dd, $J = 9,0$; 2,8 Hz, 1H, HAr), 6,99 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H, HAr), 7,29 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, HAr).

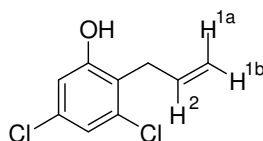
¹⁵⁵ Véase la referencia 119c.

¹⁵⁶ Véase la referencia 143.

5.1.2. Procedimiento general de síntesis de los 2-alil-clorofenoles **2a-d**

En un matraz de fondo redondo se calientan 14-15 mmol del correspondiente alilfenol **1** a 180° C durante 4 horas, bajo atmósfera de argón. Alternativamente, la reacción se puede llevar a cabo por calefacción a 220° C en etilenglicol (2mL por mmol), durante 2 h. En este caso, el aislamiento se realiza mediante extracción con disolución de NaOH 1 N. Por transposición de Claisen se obtienen los 2-alilfenoles **2a-d**. **1c** produce una mezcla de los dos posibles isómeros, **2c** y **2d**, en proporción 70:30, que se emplea como precursor de la siguiente reacción. Tanto la mezcla **2c,d** como el resto de los compuestos **2** se purifica por cromatografía en columna usando como eluyente una mezcla de hexano:acetato de etilo (95:5 → 90:10).

5.1.2.1. 2-Alil-3,5-diclorofenol, **2a**¹⁵⁷

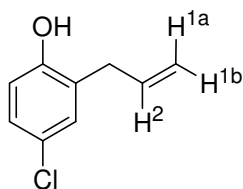


Rendimiento: 66 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 3,49 (dm, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH₂), 4,96-5,10 (m, 2H, H^{1a}, H^{1b}), 5,32 (s, 1H, OH), 5,74-5,94 (m, 1H, H²), 6,65 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, HAr), 6,90 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, HAr).

¹⁵⁷ Véase la referencia 119a.

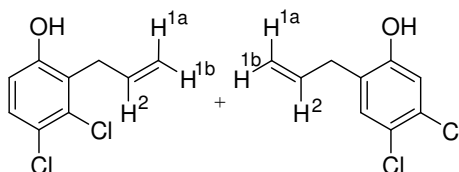
5.1.2.2. 2-Alil-4-clorofenol, **2b**¹⁵⁸



Rendimiento: 47 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 4,36 (dd, $J = 5,2; 1,5$ Hz, 2H, CH₂), 5,15-5,33 (m, 2H, H^{1a}, H^{1b}), 5,79-5,98 (m, 1H, H²), 6,68 (m, 2H, HAr), 6,81 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, HAr).

5.1.2.3. 2-Alil-3,4-diclorofenol, **2c** y 2-Alil-4,5-diclorofenol, **2d**¹⁵⁹



Rendimiento: 95 % (mezcla).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ), de la mezcla: 3,27 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH₂, **2d**), 3,56 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH₂, **2c**), 4,98-5,16 (m, H^{1a}, H^{1b}, **2c** y **2d**), 5,78-5,98 (m, H², **2c** y **2d**), 6,62 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, HAr, **2c**), 6,88 (s, 1H, HAr, **2d**), 7,04 (s, 1H, HAr, **2d**), 7,14 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, HAr, **2c**).

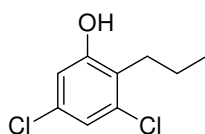
¹⁵⁸ Véase la referencia 119c.

¹⁵⁹ Véase la referencia 143.

5.1.3. Procedimiento general de síntesis de los 2-propilfenoles **3a-d**

En un vaso para hidrogenar se disuelven 9-10 mmol del correspondiente alilfenol **2a-d** en 80 mL de tolueno y 30 mL de etanol, y se hidrogenan durante 5 horas a 30 psi utilizando Ni Raney como catalizador (10 %). La suspensión resultante se filtra con celita y se concentra a vacío. La mezcla de isómeros obtenida (**3c,d**), a partir de la mezcla de **2c,d**, se separa por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo). Los productos **3a,b** se purifican por cromatografía en columna, empleando una mezcla variable de hexano:acetato de etilo.

5.1.3.1. 3,5-Dicloro-2-propilfenol, **3a**¹⁶⁰

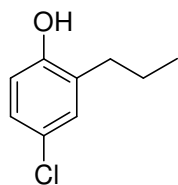


Rendimiento: 90 %, aceite.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,88 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH₃), 1,42 (sx, $J = 7,3$ Hz, 2H, CH₂), 2,62 (dd, $J = 9,0; 5,9$ Hz, 2H, CH₂Ar), 6,20 (sa, 1H, OH), 6,63 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, HAr), 6,85 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, HAr).

¹⁶⁰ Véase la referencia 119a.

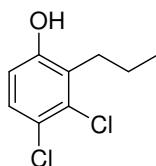
5.1.3.2. 4-Cloro-2-propilfenol, 3b¹⁶¹



Rendimiento: 70 %; aceite.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH₃), 1,56 (sx, $J = 7,4$ Hz, 2H, CH₂), 2,47 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H, CH₂Ar), 6,62 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, HAr), 6,92-7,02 (m, 2H, HAr).

5.1.3.3. 3,4-Dicloro-2-propilfenol, 3c¹⁶²



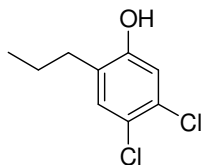
Rendimiento: 28%; aceite amarillento.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,95 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, CH₃), 1,47 (sx, $J = 7,4$ Hz, 2H, CH₂), 2,70 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, CH₂Ar), 6,57 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, HAr), 7,07 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, HAr).

¹⁶¹ Véase la referencia 119c.

¹⁶² Véase la referencia 143.

5.1.3.4. 4,5-Dicloro-2-propilfenol, **3d**¹⁶³



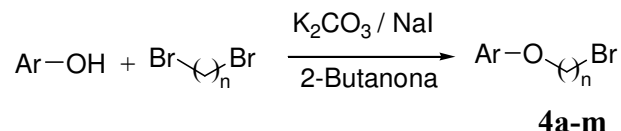
Rendimiento: 10%; aceite.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,89 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃), 1,45-1,63 (m, 2H, CH₂), 2,45 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH₂Ar), 4,87 (sa, 1H, OH), 6,89 (s, 1H, HAr), 7,09 (s, 1H, HAr).

¹⁶³ Véase la referencia 143.

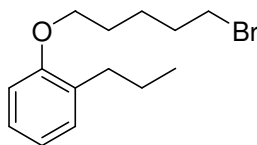
5.2. SÍNTESIS DE LOS ARIL BROMOALQUIL ÉTERES **4a-m**

5.2.1. Procedimiento general



En un matraz de fondo redondo bajo atmósfera de argón se refluxe durante 48 h una suspensión de 1 eq. (7 mmol) del correspondiente fenol, 2 eq. de dibromoalcano, 1,3 eq. de K_2CO_3 anhidro y 0,1 eq. de NaI en 20 mL de 2-butanona. La suspensión resultante se deja enfriar, se filtra a vacío, se evapora a sequedad y se disuelve en éter etílico (30 mL), se lava con agua (2x20 mL) y la fase orgánica se seca con sulfato sódico, se filtra y se evapora a vacío. Todos los productos se purifican por cromatografía en columna (hexano \rightarrow hexano:acetato de etilo, 1:2) y posterior destilación a vacío (horno de bolas), obteniéndose los productos deseados como aceites transparentes. Los rendimientos de estos procesos no han sido optimizados.

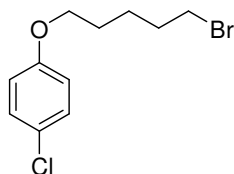
5.2.1.1. 5-Bromopentil 2-propilfenil éter, **4a**



Rendimiento: 65 %.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3 , δ): 0,87 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1,44-1,65 (m, 4H, 2CH_2), 1,70-1,95 (m, 4H, 2CH_2), 2,52 (tap, $J = 7,4$ Hz, 2H, CH_2Ar), 3,33 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 3,89 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H, CH_2O), 6,72-6,83 (m, 2H, HAr), 7,03-7,11 (m, 2H, HAr).

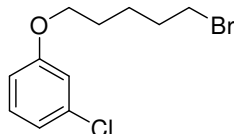
5.2.1.2. 5-Bromopentil 4-clorofenil éter, **4b**¹⁶⁴



Rendimiento: 62 %.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1,54-1,65 (m, 2H, CH₂), 1,74-1,80 (m, 2H, CH₂), 1,86-1,96 (m, 2H, CH₂), 3,42 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, CH₂Br), 3,91 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 6,79 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, HAr), 7,20 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, HAr).

5.2.1.3. 5-Bromopentil 3-clorofenil éter, **4c**¹⁶³

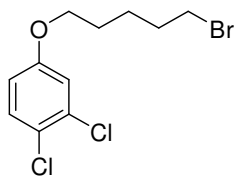


Rendimiento: 60 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,46-1,62 (m, 2H, CH₂), 1,67-1,94 (m, 4H, 2CH₂), 3,37 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, CH₂Br), 3,88 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 6,67-6,73 (m, 1H, HAr), 6,80-6,87 (m, 2H, HAr), 7,12 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, HAr).

¹⁶⁴ (a) Abbot Lab. BE628766, **1963**. [Chem. Abst. 608044, **1964**]; (b) Ganellin, C. R.; Leurquin, F.; Piriotsi, A.; Arrang, J. M.; Garabarg, M., *Arch. Pharm.*, **1998**, 331, 395.

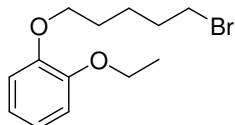
5.2.1.4. 5-Bromopentil 3,4-diclorofenil éter, **4d**



Rendimiento: 65 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,44-1,61 (m, 2H, CH₂), 1,67-1,91 (m, 4H, 2CH₂), 3,37 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂Br), 3,86 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 6,67 (dd, *J* = 8,9; 2,9 Hz, 1H, HAr), 6,91 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H, HAr), 7,24 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, HAr).

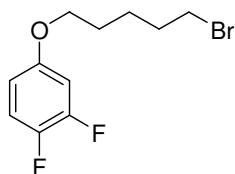
5.2.1.5. 5-Bromopentil 2-etoxyfenil éter, **4e**



Rendimiento: 60 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,30-1,42 (m, 5H, CH₃, CH₂), 1,79-1,98 (m, 4H, 2CH₂), 3,25-3,32 (m, 2H, CH₂Br), 4,01-4,13 (m, 4H, 2CH₂O), 6,47-6,60 (m, 4H, 4HAr).

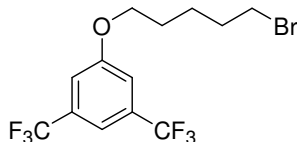
5.2.1.6. 5-Bromopentil 3,4-difluorofenil éter, **4f**



Rendimiento: 23 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,42-1,91 (m, 6H, 3CH₂), 3,37 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂Br), 3,83 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 6,41-6,65 (m, 2H, HAr), 6,98 (m, *J* = 9,2 Hz, 1H, HAr).

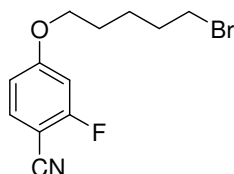
5.2.1.7. 5-Bromopentil 3,5-bis(trifluorometil)fenil éter, **4g**



Rendimiento: 12 %.

¹H-RMN (200MHz, CDCl₃, δ): 1,48-1,69 (m, 2H, CH₂), 1,70-1,95 (m, 4H, 2CH₂), 3,37 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂Br), 3,97 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 7,21 (s, 2H, HAr), 7,37 (s, 1H, HAr).

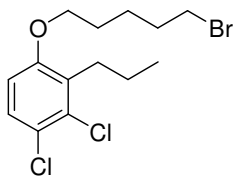
5.2.1.8. 5-Bromopentil 4-ciano-3-fluorofenil éter, **4h**



Rendimiento: 65 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,48-1,65 (m, 2H, CH₂), 1,71-1,94 (m, 4H, 2CH₂), 3,37 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂Br), 3,94 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 6,59-6,71 (m, 2H, HAr), 7,44 (tap, *J* = 8,1 Hz, 1H, HAr).

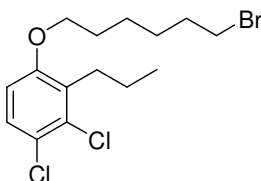
5.2.1.9. 5-Bromopentil 3,4-dicloro-2-propilfenil éter, **4j**



Rendimiento: 33 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,13 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH₃), 1,67-2,20 (m, 8H, 4CH₂), 2,97 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H, CH₂Ar), 3,63 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, CH₂Br), 4,13 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH₂O), 6,86 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, HAr), 7,41 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, HAr).

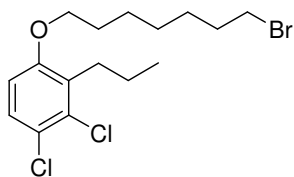
5.2.1.10. 6-Bromohexil 3,4-dicloro-2-propilfenil éter, **4k**



Rendimiento: 60 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,91 (t, $J = 5,7$ Hz, 3H, CH₃), 1,23-1,41 (m, 4H, 2CH₂), 1,49-1,62 (m, 2H, CH₂), 1,77-1,93 (m, 4H, 2CH₂), 2,70 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, CH₂Ar), 3,36 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, CH₂Br), 3,96 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, CH₂O), 6,52 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, HAr), 7,21 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, HAr).

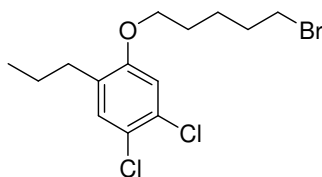
5.2.1.11. 7-Bromoheptil 3,4-dicloro-2-propilfenil éter, **4l**



Rendimiento: 52 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,87 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 1,17-1,94 (m, 12H, 6CH₂), 2,70 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH₂-Ar), 3,35 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂Br), 3,86 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH₂O), 6,58 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, HAr), 7,13 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, HAr).

5.2.1.12. 5-Bromopentil 4,5-dicloro-2-propilfenil éter, **4m**

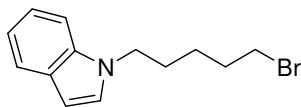


Rendimiento: 63 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,84 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 1,38-1,90 (m, 8H, 4CH₂), 2,45 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,37 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂Br), 3,82 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH₂O), 6,79 (s, 1H, HAr), 7,13 (s, 1H, HAr).

5.2.1.13. Síntesis de 1-(5-bromopentil)-1*H*-indol, **4i**¹⁶⁵

Sobre una disolución de 34,47 g (150 mmol) de 1,5-dibromopentano en 200 mL de THF se añaden 5,85 g (50 mmol) de indol y 2,85 (50 mmol) de KOH en polvo. La mezcla de reacción se calienta durante 20 horas a una temperatura de 30-40° C. A continuación se añaden 100 mL de agua y se extrae con éter etílico (3×50 mL), se lava con agua, se seca con MgSO₄ y se elimina el disolvente a vacío. El producto final se purifica en columna de gel de sílice empleando hexano como eluyente. Se obtiene un líquido transparente que se guarda bajo argón a + 4° C.



Rendimiento: 60 %; aceite.

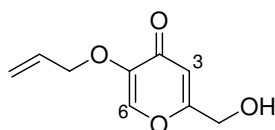
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,36-1,63 (m, 2H, CH₂), 1,88-2,03 (m, 4H, 2CH₂), 3,45 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, CH₂Br), 4,23 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂N), 6,59 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, H³), 7,16-7,45 (m, 4H, HAr), 7,73 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H⁴).

¹⁶⁵ Véase la referencia 118.

5.3. SÍNTESIS DE 3-HIDROXI-6-(HIDROXIMETIL)-2-[(1*E*)-PROP-1-ENIL]-4*H*-PIRAN-4-ONA, **6**

5.3.1. Síntesis de 5-aliloxi-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **5**

En un matraz de fondo redondo y bajo atmósfera de argón se calienta una disolución de 255 mg (2,11 mmol) de bromuro de alilo, 240 mg (1,69 mmol) de ácido kójico y 520 mg (3,80 mmol) de carbonato potásico en 10 mL de DMF a 50° C durante 48 horas. El crudo de reacción se filtra a vacío y el residuo se lava con acetato de etilo. El disolvente se evapora a vacío y el producto se purifica por cromatografía en columna (acetato de etilo) obteniéndose 200 mg (65%) de **5**.

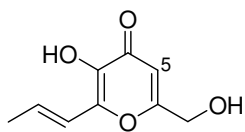


Rendimiento: 65 %.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 4,36 (s, 2H, CH₂OH), 4,43 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H, CH₂O), 5,21-5,35 (m, 2H, CH₂=), 5,89-6,04 (m, 1H, CH=), 6,46 (s, 1H, H³), 7,53 (s, 1H, H⁶).

5.3.2. Síntesis de 3-hidroxi-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **6**

En un horno de bolas se calientan 1,25 g de **5** a 200° C y a vacío (1 mm Hg aproximadamente) durante 20 minutos. Se obtienen 1,18 g (95 %) de una mezcla de los dos isómeros resultantes de la transposición: alilo y propenilo, en la que el isómero mayoritario es el propenilo (10:1); por cromatografía en columna (acetato de etilo) se aísla un sólido blanco que corresponde principalmente al producto **6**, 850 mg (68 %; mezclado siempre con cantidades variables, en torno al 10 %, del isómero minoritario, con el grupo alilo). Esta mezcla se utiliza en las siguientes reacciones, observándose en los productos finales la completa isomerización del grupo alilo a 1-propenilo.



Rendimiento: 68 %.

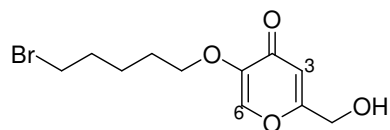
¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,88 (d, $J = 5,7$ Hz, 3H, CH₃), 4,27 (sa, 2H, CH₂OH), 5,08-5,16 (m, 1H, CH=), 5,63 (sa, 1H, OH), 5,77-5,96 (m, 1H, CH=), 6,48 (s, 1H, H⁵), 8,88 (sa, 1H, OH).

5.4. SÍNTESIS DE LAS 5-BROMOPENTILOXI-4*H*-PIRAN-4-ONAS, **7a,b**

5.4.1. Procedimiento general

Sobre una suspensión de 1 eq. de ácido kójico o de su derivado **6**, 1,3 eq. de K₂CO₃ y 0,1 eq. de NaI en 150 mL de DMF, se añaden gota a gota 2 eq. de 1,5-dibromopentano. La mezcla de reacción se calienta a 80° C durante 24 horas, se filtra y el disolvente se elimina a vacío. Los productos finales se purifican por cromatografía en columna, empleando como eluyente hexano → hexano:acetato 1:1.

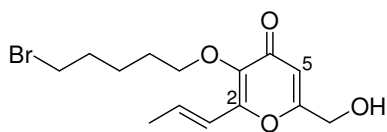
5.4.1.1. 5-(5-Bromopentiloxi)-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **7a**



Rendimiento: 54 %.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,47-1,65 (m, 2H, CH₂), 1,75-1,98 (m, 4H, 2CH₂), 3,23 (sa, 1H, OH), 3,36 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂Br), 3,82 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, CH₂O), 4,44 (s, 2H, CH₂OH), 6,54 (s, 1H, H³), 7,57 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 24,5, 28,2, 32,3, 33,5 (CH₂Br), 60,8 (CH₂OH), 69,6 (CH₂O), 111,7 (C³), 139,8 (C⁶), 147,6 (C⁵), 167,9 (C²), 174,6 (C=O).



Rendimiento: 53 %.

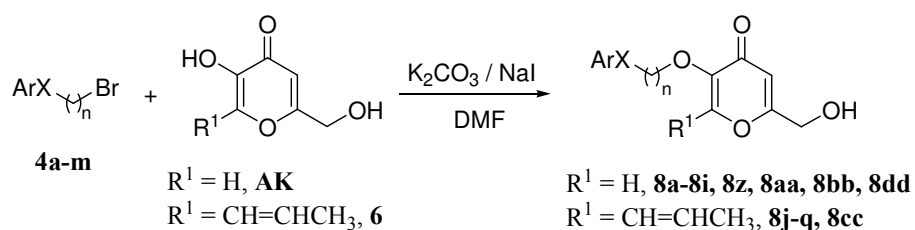
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,80-2,18 (m, 9H, 1CH₃ y 3CH₂), 3,08 (sa, 1H, OH), 3,63 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂Br), 4,27 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH₂O), 4,73 (s, 2H, CH₂OH), 6,73-6,86 (m, 3H, 2CH=, H⁵).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 19,1 (CH₃), 24,7, 29,3, 32,6, 33,9 (CH₂Br), 61,0 (CH₂OH), 72,6 (CH₂O), 112,2 (C⁵), 118,8 (CH=), 135,1 (CH=), 141,5 (C³), 155,3 (C²), 166,6 (C⁶), 176,8 (C=O).

5.5. SÍNTESIS DE LAS HIDROXIMETIL-4*H*-PIRAN-4-ONAS, **8a-dd**

5.5.1. Procedimiento general

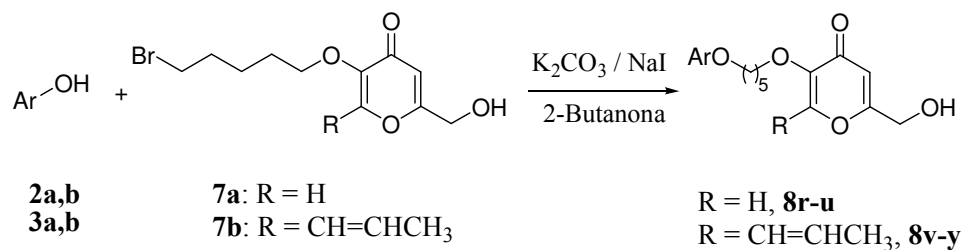
Método A



Esquema 5.1.

En un matraz de fondo redondo y bajo atmósfera de argón se calienta a 50° C durante 48 h 1,00 eq. (1-2 mmol) de ácido kójico o su derivado **6**, 1,25 eq. del correspondiente bromopentil derivado **4a-m** y 2,25 eq. de carbonato potásico anhidro, en 10 mL de DMF. El crudo de reacción se filtra, se lava con acetato de etilo y el disolvente se evapora a sequedad. El residuo sólido se vuelve a suspender en acetato de etilo y se filtra. El disolvente se evapora de nuevo y los diferentes productos se purifican por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo, 1:1, aumentando progresivamente la polaridad) y posterior cristalización.

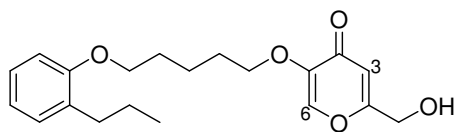
Método B



Esquema 5.2.

En un matraz de fondo redondo se introduce 1,00 eq. (0,96 mmol) de **7a** o **7b**, 1,17 eq. de K₂CO₃, una punta de espátula de NaI, 0,91 eq. del fenol correspondiente y 3 mL de 2-butanona. La mezcla de reacción se calienta a 80° C durante 24 horas. El crudo de reacción se enfría, se filtra, y el disolvente se elimina a vacío. El crudo se suspende en éter etílico y se lava con agua y a continuación se seca (MgSO₄) y se evapora. Los productos de reacción se purifican por cromatografía en columna, empleando hexano:acetato de etilo 1:1 como eluyente.

5.5.1.1. 2-(Hidroximetil)-5-[5-(2-propilfenoxi)pentiloxi]-4*H*-piran-4-ona, **8a**



Rendimiento: 73 %; aceite.

R_f : 0,3 (acetato de etilo).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3350, 2954, 2933, 1649, 1612, 1492, 1452, 1242, 1151, 1126.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,85 (t, J = 6,9 Hz, 3H, CH₃), 1,45-1,95 (m, 8H, 4CH₂), 2,50 (t, J = 7,9 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,25 (t, J = 6,5 Hz, 1H, OH), 3,80 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂O), 3,90 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH₂O), 4,45 (d, J = 7,7 Hz, 2H, CH₂OH), 6,45 (s, 1H, H³), 6,65-6,85 (m, 2H, HAr), 6,95-7,10 (m, 2H, HAr), 7,45 (s, 1H, H⁶).

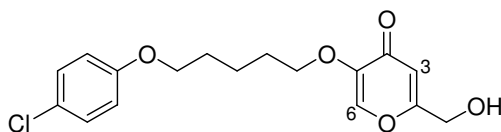
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 14,1 (CH₃), 22,6, 23,0, 28,8, 29,1, 32,3 (CH₂Ar), 60,8 (CH₂OH), 67,4 (CH₂O), 69,7 (CH₂O), 111,1 (C³), 111,8, 120,2, 126,8, 129,9, 131,2, 139,5 (C⁶), 147,8 (C⁵), 156,8 (CO), 167,5 (C²), 174,9 (C=O).

Análisis elemental de C₂₀H₂₆O₅

Calculado: C, 69,36 %; H, 7,51 %.

Encontrado: C, 69,35 %; H, 7,44 %.

5.5.1.2. 5-[5-(4-Clorofenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **8b**



Rendimiento: 75 %; sólido, pf: 95-97° C (acetato de etilo:hexano).

***R_f*:** 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3265, 3088, 2951, 1641, 1610, 1589, 1491, 1263, 1238, 1227.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,50-1,68 (m, 2H, CH₂), 1,72-1,85 (m, 4H, 2CH₂), 3,35 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H, OH), 3,80 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂O), 3,87 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂O), 4,41 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, CH₂OH), 6,44 (s, 1H, H³), 6,73 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, HAr), 7,15 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, HAr), 7,49 (s, 1H, H⁶).

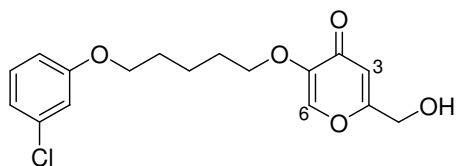
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 22,3, 28,6, 28,7, 60,7 (CH₂OH), 67,8 (CH₂O), 69,4 (CH₂O), 111,8 (C³), 115,6 (2C), 127,1, 129,1 (2C), 139,2 (C⁶), 147,7 (C⁵), 157,4 (CO), 166,8 (C²), 174,6 (C=O).

Análisis Elemental de C₁₇H₁₉ClO₅

Calculado: C, 60,23 %; H, 5,61 %.

Encontrado: C, 60,28 %; H, 5,91 %.

5.5.1.3. 5-[5-(3-Clorofenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **8c**



Rendimiento: 71 %; sólido, pf: 87-88 ° C (acetato de etilo:hexano).

R_f : 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm^{-1}): 3248, 3082, 3060, 2955, 2906, 2874, 1645, 1608, 1589, 1573, 1479, 1452, 1278.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 1,45-1,61 (m, 2H, CH_2), 1,69-1,87 (m, 4H, 2CH_2), 3,79 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2O), 3,87 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2O), 3,99 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, OH), 4,41 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2OH), 6,45 (s, 1H, H^3), 6,71 (dd, $J = 2,4; 0,8$ Hz, 1H, HAr), 6,83 (m, 2H, HAr), 7,11 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, HAr), 7,55 (s, 1H, H^6).

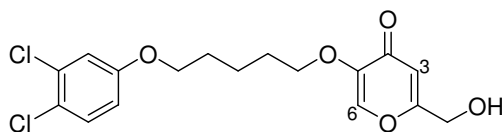
^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 22,6, 28,8, 28,9, 60,9 (CH_2OH), 67,9 (CH_2O), 69,6 (CH_2O), 111,9 (C^3), 113,1, 115,1, 120,8, 130,3, 134,9, 139,5 (C^6), 147,9 (C^5), 159,8 (CO), 167,6 (C^2), 175,1 ($\text{C}=\text{O}$).

Análisis Elemental de $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClO}_5$

Calculado: C, 60,23 %; H, 5,61 %.

Encontrado: C, 60,20 %; H, 5,59 %.

5.5.1.4. 5-[5-(3,4-Diclorofenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **8d**



Rendimiento: 73 %; sólido, pf: 97-99° C (acetato de etilo:hexano).

***R_f*:** 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3377, 3115, 3055, 2952, 2873, 1645, 1606, 1469, 1375, 1230, 1112, 1053, 918, 856.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,51-1,65 (m, 2H, CH₂), 1,76-1,86 (m, 4H, 2CH₂), 3,40 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, OH), 3,82 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 3,89 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 4,44 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂OH), 6,49 (s, 1H, H³), 6,70 (dd, *J* = 8,7; 3,0 Hz, 1H, HAr), 6,93 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, HAr), 7,26 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, HAr), 7,53 (s, 1H, H⁶).

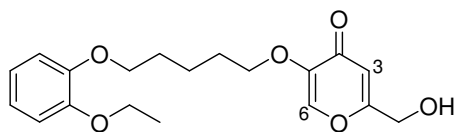
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 22,6, 28,8 (2C), 61,0 (CH₂OH), 68,4 (CH₂O), 69,7 (CH₂O), 112,1 (C³), 114,6, 116,4, 123,6, 130,8, 132,9, 139,5 (C⁶), 147,9 (C⁵), 158,2 (CO), 167,3 (C²), 174,9 (C=O).

Análisis Elemental de C₁₇H₁₈Cl₂O₅

Calculado: C, 54,71 %; H, 4,86 %.

Encontrado: C, 54,66 %; H, 5,02 %.

5.5.1.5. 5-[5-(2-Etoxifenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **8e**



Rendimiento: 75 %; sólido, pf: 75–76° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3367, 3010, 2983, 2941, 2873, 1647, 1612, 1593, 1504, 1475, 1452, 1394, 1251, 1151, 1126, 866.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,35 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, CH₃), 1,52-1,64 (m, 2H, CH₂), 1,74-1,91 (m, 4H, 2CH₂), 2,71 (sa, 1H, OH), 3,82 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH₂O), 3,95 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH₂O), 4,02 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, CH₂O), 4,41 (s, 2H, CH₂OH), 6,47 (s, 1H, H³), 6,82 (s, 4H, HAr), 7,51 (s, 1H, H⁶).

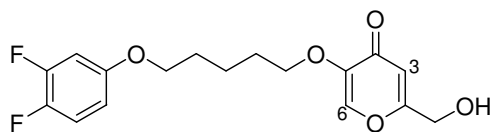
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 14,8 (CH₃), 22,3, 28,6, 28,7, 60,8 (CH₂OH), 64,5 (CH₂O), 68,8 (CH₂O), 69,5 (CH₂O), 111,9 (C³), 113,9, 114,1, 121,0, 121,1, 139,3 (C⁶), 147,7 (C⁵), 148,8, 166,7 (C²), 174,6 (C=O).

Análisis elemental de C₁₉H₂₄O₆

Calculado: C, 65,51 %; H, 6,89 %.

Encontrado: C, 65,41 %; H, 7,03 %.

5.5.1.6. 5-[5-(3,4-Difluorofenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **8f**



Rendimiento: 33 %; sólido, pf: 83-86° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1/1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3292, 2957, 1647, 1610, 1514, 1259, 1198.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,46-1,58 (m, 2H, CH₂), 1,65-1,84 (m, 4H, 2CH₂), 3,24 (sa, 1H, OH), 3,73 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH₂O), 3,80 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 4,38 (s, 2H, CH₂OH), 6,62-6,75 (m, 3H, 2HAr, H³), 7,03 (m, 1H, HAr), 7,48 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 22,5, 28,7, 28,8, 60,8 (CH₂OH), 68,4 (CH₂O), 69,6 (CH₂O), 104,0 (d, *J* = 20,3 Hz, *Co,mF*), 109,7 (dd, *J* = 6,0; 3,5 Hz, *Cm,pF*), 111,8 (C³), 117,1 (dd, *J* = 18,4; 1,8 Hz, *Co,mF*), 139,5 (C⁶), 144,9 (dd, *J* = 252,3; 12,7 Hz, CF), 147,8 (C⁵), 150,3 (dd, *J* = 247,5; 13,5 Hz, CF), 155,3 (d, *J* = 8,5 Hz, CO), 167,5 (C²), 174,8 (C=O).

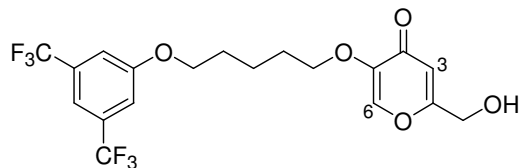
EM: 340 (M), 211, 198, 193, 179, 167, 143, 130, 113, 101, 95, 70, 69, 55, 41 (100).

Análisis Elemental de C₁₇H₁₈F₂O₅

Calculado: C, 60,00 %; H, 5,33 %.

Encontrado: C, 59,96 %; H, 5,15 %.

5.5.1.7. 5-{5-[3,5-Bis(trifluorometil)fenoxi]pentiloxi}-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona,
8g



Rendimiento: 19 %; sólido, pf: 92-95° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3344, 2941, 1651, 1618, 1602, 1375, 1281, 1171, 1126.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,54-1,63 (m, 2H, CH₂), 1,78-1,92 (m, 4H, 2CH₂), 3,23 (sa, 1H, OH), 3,82 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 3,98 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H, CH₂O), 4,41 (s, 2H, CH₂OH), 6,47 (s, 1H, H³), 7,21 (s, 2H, HAr), 7,36 (s, 1H, HAr), 7,51 (s, 1H, H⁶).

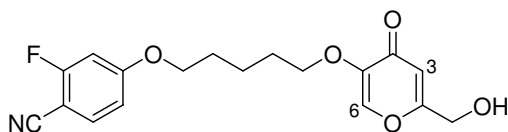
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 22,3, 28,5, 28,6, 60,7 (CH₂OH), 68,4 (CH₂O), 69,4 (CH₂O), 111,7 (C³), 114,1 (m, C_{OC}CF₃), 114,7 (m, 2C_{OC}CF₃), 123,2 (q, *J* = 272,0 Hz, 2CF₃), 132,7 (q, *J* = 33,3 Hz, 2C_{CF}CF₃), 139,5 (C⁶), 147,8 (C⁵), 159,6 (CO), 167,6 (C²), 174,9 (C=O).

Análisis Elemental de C₁₉H₁₈F₆O₅

Calculado: C, 51,83 %; H, 4,12 %.

Encontrado: C, 51,80 %; H, 4,22 %.

5.5.1.8. 5-[5-(4-Ciano-3-fluorofenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona*, **8h**



Rendimiento: 95 %; sólido, pf: 126-128° C (éter etílico).

R_f: 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3371, 3090, 2949, 2226, 1639, 1620, 1607, 1508, 1445, 1302, 1232, 1121, 1009, 920, 885, 849.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,51-1,68 (m, 2H, CH₂), 1,70-1,91 (m, 4H, 2CH₂), 2,30 (sa, 1H, OH), 3,82 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 3,95 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H, CH₂O), 4,42 (s, 2H, CH₂OH), 6,47 (s, 1H, H³), 6,59-6,70 (m, 2H, HAr), 7,39-7,51 (m, 2H, HAr, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 22,6, 28,7, 28,8, 61,1 (CH₂OH), 68,9 (CH₂O), 69,7 (CH₂O), 92,9 (d, *J* = 10,1 Hz, C_{CN}), 102,9 (d, *J* = 22,9 Hz, C_{oF}), 111,8 (C³), 112,2, 114,6 (CN), 134,3, 139,6 (C⁶), 147,9 (C⁵), 164,2 (d, *J* = 11,0 Hz, CO), 164,5 (d, *J* = 250,1 Hz, CF), 174,8 (C=O).

EM: 348 (M+1), 316, 211, 198, 179, 167, 155, 142, 126, 113, 95, 85, 69, 55, 41 (100).

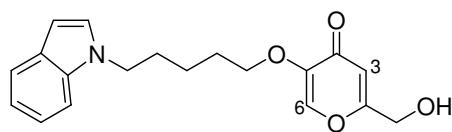
Análisis Elemental de C₁₈H₁₈FNO₅

Calculado: C, 62,24 %; H, 5,22 %; N, 4,03 %.

Encontrado: C, 61,98 %; H, 5,37 %; N, 4,00 %.

* El nombre IUPAC de este compuesto es 2-Fluoro-4-({5-[6-(hidroximetil)-4-oxo-4H-piran-3-il]oxi}pentiloxi)benzonitrilo; sin embargo, se emplea la misma nomenclatura y numeración que en el resto de los compuestos con el fin de compararlos con mayor facilidad.

5.5.1.9. 2-(Hidroximetil)-5-[5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]- 4*H*-piran-4-ona, **8i**



Rendimiento: 95 %; sólido, pf: 107-109° C (acetato de etilo).

R_f: 0,2 (éter etílico:metanol 8:2).

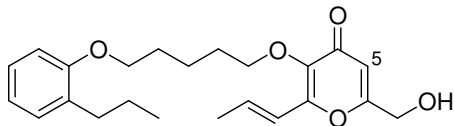
IR (KBr, cm⁻¹): 3284, 3080, 2851, 2669, 1641, 1618, 1448, 1315, 1261, 1196, 749.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,20-1,36 (m, 2H, CH₂), 1,56-1,79 (m, 4H, 2CH₂), 2,39 (sa, 1H, OH), 3,60 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 3,97 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 4,29 (s, 2H, CH₂OH), 6,30 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, H³_i), 6,35 (s, 1H, H³), 6,87-7,00 (m, 2H, H²_i, H⁵_i), 7,02 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,09 (s, 1H, H⁶), 7,16 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H⁷_i), 7,45 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 23,5, 28,8, 30,1, 46,4 (CH₂N), 61,0 (CH₂OH), 69,6 (CH₂O), 101,2 (C³_i), 109,5 (C⁷_i), 112,1 (C³), 119,4, 121,1, 121,5, 128,0, 128,8, 139,6, 147,9 (C⁵), 167,4 (C²), 174,9 (C=O).

EM: 327 (M), 311, 296, 268, 226, 185, 170, 156, 143, 130 (100), 117, 103, 77, 69, 55, 41.

5.5.1.10. 6-(Hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-3-[5-(2-propilfenoxi)pentiloxi]-4*H*-piran-4-ona, **8j**



Rendimiento: 75 %; sólido, pf: 67-68° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo:hexano, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3367, 2954, 2868, 1654, 1641, 1601, 1452, 1240, 1191, 968.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,01 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 1,53 (m, 4H, 2CH₂), 1,77 (m, 4H, 2CH₂), 2,14 (d, *J* = 5,7 Hz, 3H, CH₃), 2,66 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,96 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, CH₂O), 4,07 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, CH₂O), 4,56 (s, 2H, CH₂OH), 6,61 (s, 1H, H⁵), 6,68-6,75 (m, 2H, CH=), 6,85-6,97 (m, 2H, HAr), 7,15-7,25 (m, 2H, HAr).

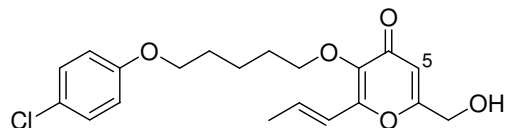
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 14,1 (CH₃C), 18,9 (CH₃C=), 22,6, 23,1, 29,2, 29,7, 32,4 (CH₂Ar), 60,9 (CH₂OH), 67,6 (CH₂O), 72,8 (CH₂O), 111,1 (C⁵), 112,1, 118,7, 120,2, 126,8, 129,9, 131,2, 134,8, 141,4, 155,2, 156,9 (CO), 168,0 (C⁶), 176,3 (C=O).

Análisis Elemental de C₂₃H₃₀O₅

Calculado: C, 71,48 %; H, 7,82 %.

Encontrado: C, 70,92 %; H, 7,81 %.

5.5.1.11. 3-[5-(4-Clorofenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8k**



Rendimiento: 75 %; sólido, pf: 84-85° C (acetato de etilo:hexano).

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo:hexano, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3350, 3012, 2943, 1718, 1654, 1641, 1596, 1560, 1492, 1473, 1436, 1286, 1244, 1217, 1197, 1171, 1153.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,48-1,79 (m, 6H, 3CH₂), 1,85 (d, *J* = 4,9 Hz, 3H, CH₃), 3,86 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 4,00 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 4,42 (sa, 2H, CH₂OH), 6,41 (s, 1H, H⁵), 6,48-6,53 (m, 2H, CH=), 6,70 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, HAr), 7,14 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, HAr).

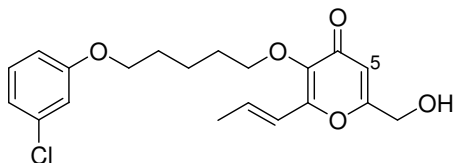
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 18,7 (CH₃), 22,3, 28,7, 29,5, 60,6 (CH₂OH), 67,9 (CH₂O), 72,4 (CH₂O), 112,0 (C⁵), 115,6, 118,54, 125,2, 129,1, 134,4, 141,2, 154,8, 157,5 (CO), 166,1 (C⁶), 176,6 (C=O).

Análisis Elemental de C₂₀H₂₃ClO₅

Calculado: C, 63,41 %; H, 6,07 %.

Encontrado: C, 64,26 %; H, 6,03 %.

5.5.1.12. 3-[5-(3-Clorofenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8I**



Rendimiento: 77 %; sólido, pf: 50-51 ° C (éter etílico).

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo:hexano, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3392, 3018, 2943, 1654, 1643, 1595, 1469, 1436, 1284.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,45-1,81 (m, 6H, 3CH₂), 1,85 (d, *J* = 5,1 Hz, 3H, CH₃), 3,88 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 3,98 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, CH₂O), 4,41 (s, 2H, CH₂OH), 6,36 (s, 1H, H⁵), 6,42-6,52 (m, 2H, CH=), 6,68 (dd, *J* = 7,1, 1,3 Hz, 1H, HAr), 6,82 (m, 2H, HAr), 7,71 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H, HAr).

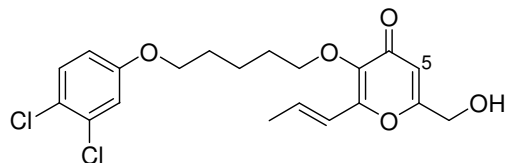
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 18,9 (CH₃), 22,4, 28,9, 29,6, 60,9 (CH₂OH), 68,0 (CH₂O), 72,5 (CH₂O), 112,2 (C⁵), 113,0, 114,8, 118,7, 120,7, 130,1, 134,5, 134,8, 141,4, 154,8, 159,8 (CO), 165,9 (C⁶), 176,7 (C=O).

Análisis Elemental de C₂₀H₂₃ClO₅

Calculado: C, 63,41 %; H, 6,12 %.

Encontrado: C, 62,64 %; H, 6,09 %.

5.5.1.13. 3-[5-(3,4-Diclorofenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8m**



Rendimiento: 77 %; sólido, pf: 100-101° C (acetato de etilo:hexano, 1:1).

***R_f*:** 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3221, 2947, 2851, 2343, 1659, 1643, 1601, 1568, 1481, 1464, 1439, 1296, 1234, 962.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,45-1,81 (m, 6H, 3CH₂), 1,86 (d, *J* = 5,0 Hz, 3H, CH₃), 2,97 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, OH), 3,85 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂O), 4,02 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂O), 4,41 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂OH), 6,35 (s, 1H, H⁵), 6,49-6,55 (m, 2H, 2CH=), 6,67 (dd, *J* = 9,0; 3,0 Hz, 1H, HAr), 6,91 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, HAr), 7,23, (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, HAr).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 18,7 (CH₃), 22,2, 28,6, 29,5, 60,9 (CH₂OH), 68,2 (CH₂O), 72,2 (CH₂O), 112,2 (C⁵), 114,4, 116,1, 118,6, 123,5, 130,4, 132,6, 134,1, 141,3, 154,5, 158,0 (CO), 165,0 (C⁶), 176,2 (C=O).

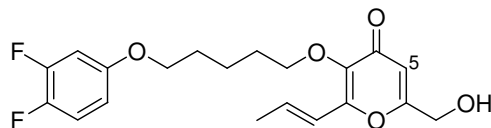
EM: 412 (M), 397, 383, 359, 357, 253, 251, 233, 209, 183, 167 (100), 156, 135, 111, 95, 83, 69, 41, 39.

Análisis Elemental de C₂₀H₂₂Cl₂O₅

Calculado: C, 58,12 %; H, 5,37 %.

Encontrado: C, 58,02 %; H, 5,39 %.

5.5.1.14. 3-[5-(3,4-Difluorofenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8n**



Rendimiento: 69 %; sólido, pf: 86-87° C (éter etílico).

***R_f*:** 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3265, 2992, 2852, 1662, 1635, 1601, 1581, 1213, 1161, 1091, 988.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,49-1,51 (m, 2H, CH₂), 1,52-1,80 (m, 4H, 2CH₂), 1,86 (d, *J* = 4,8 Hz, 3H, CH₃), 3,61 (s, 1H, OH), 3,84 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 3,98 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 4,40 (s, 2H, CH₂OH), 6,30-6,41 (m, 1H, H⁵), 6,42-6,37 (m, 4H, 2CH=, 2H, HAr), 7,03 (q, *J* = 9,3 Hz, 1H, HAr).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 18,9 (CH₃), 22,5, 28,9, 29,7, 60,9 (CH₂OH), 68,7 (CH₂O), 72,6 (CH₂O), 104,1 (d, *J* = 20,2 Hz, *Co,mF*), 109,7 (dd, *J* = 6,0; 3,5 Hz, *Com,pF*), 112,2 (C⁵), 119,1 (dd, *J* = 18,5; 2,6 Hz, *Co,mF*), 118,8, 134,7, 141,4, 144,8 (dd, *J* = 239,5; 13,1 Hz, CF), 150,4 (dd, *J* = 248,0; 14,9 Hz, CF), 155,0, 155,4 (dd, *J* = 10,6; 4,7 Hz, *Com,pF*), 166,3 (C⁶), 176,8 (C=O).

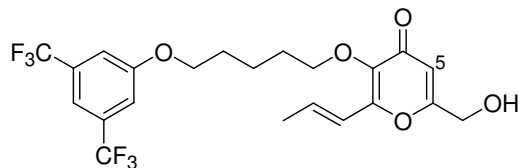
EM: 380 (M), 365, 351, 325, 285, 251, 237, 223, 209, 195, 181, 165 (100), 143, 135, 113, 101, 83, 69, 55, 41.

Análisis Elemental de C₂₀H₂₂F₂O₅

Calculado: C, 63,15 %; H, 5,83 %.

Encontrado: C, 63,61 %; H, 5,95 %.

5.5.1.15. 3-{5-[3,5-Bis-(trifluorometil)fenoxi]pentiloxi}-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8ñ**



Rendimiento: 46 %; sólido, pf: 90-92° C (éter etílico).

***R_f*:** 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3443, 3277, 2951, 2879, 1664, 1635, 1610, 1591, 1379, 1369, 1284, 1169, 1122.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,59-2,01 (m, 9H, CH₃, 3CH₂), 2,58 (sa, 1H, OH), 4,10 (m, 4H, 2CH₂O), 4,54 (s, 2H, CH₂OH), 6,54-6,65 (m, 2H, 1CH=, H⁵), 7,22-7,40 (m, 3H, 2HAr, 1CH=), 7,45 (s, 1H, HAr).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 18,9 (CH₃), 22,5, 28,8, 29,7, 61,0 (CH₂OH), 68,8 (CH₂O), 72,6 (CH₂O), 112,1 (C⁵), 114,2 (C_oCCF₃), 114,9 (2C_oCCF₃), 118,7 (CH=), 123,2 (q, *J* = 270,8 Hz, 2CF₃), 132,8 (d, *J* = 33,1 Hz, 2CCF₃), 134,7 (CH=), 141,5 (C²), 155,0 (C³), 159,8 (CO), 166,0 (C⁶), 176,5 (C=O).

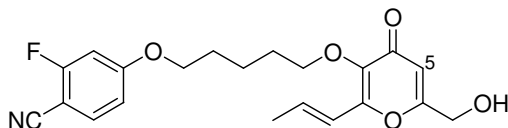
EM: 480 (M), 465, 451, 425, 251, 237, 209, 195, 181, 167 (100), 135, 121, 95, 69, 55, 41.

Análisis Elemental de C₂₂H₂₂F₆O₅

Calculado: C, 55,00 %; H, 4,62 %.

Encontrado: C, 54,62 %; H, 4,87 %.

5.5.1.16. 3-[5-(4-Ciano-3-fluorofenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona^{**}, **8p**



Rendimiento: 60 %; sólido, pf: 123-125° C (éter etílico).

***R_f*:** 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3430, 3240, 2870, 2230, 1662, 1622, 1603, 1506, 1439, 1300, 1234, 1205, 1178, 1121, 962.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,56-1,63 (m, 2H, CH₂), 1,71-1,88 (m, 7H, 1CH₃, 2CH₂), 2,73 (sa, 1H, OH), 3,93-4,03 (m, 4H, 2CH₂O), 4,42 (s, 2H, CH₂OH), 6,36-6,71 (m, 5H, H⁵, 2HAr, 2CH=), 7,39-7,47 (m, 1H, HAr).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 18,9 (CH₃), 22,3, 28,6, 29,6, 61,0 (CH₂OH), 68,9 (CH₂O), 72,4 (CH₂O), 92,8 (d, *J* = 10,1 Hz, CCN), 102,7 (d, *J* = 22,1 Hz, CoF), 111,7 (CpF), 112,3 (C⁵), 114,4 (CN), 118,7 (CH=), 134,1 (CH=), 134,3 (d, *J* = 15,2 Hz, CHAr), 141,5 (C²), 154,8 (C³), 164,0 (d, *J* = 14,0 Hz, CO), 164,5 (d, *J* = 250,0 Hz, CF), 165,6 (C⁶), 176,4 (C=O).

EM: 387 (M), 372, 358, 326, 251, 237, 209, 195, 181, 167 (100), 150, 135, 120, 95, 83, 69, 55, 41.

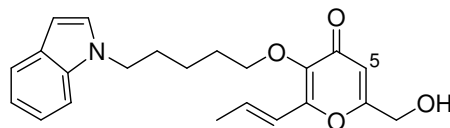
Análisis Elemental de C₂₁H₂₂FNO₅

Calculado: C, 65,11 %; H, 5,72 %; N, 3,62 %.

Encontrado: C, 64,92 %; H, 5,64 %; N, 3,57 %.

^{**} El nombre IUPAC de este compuesto es 2-Fluoro-4-({5-[6-(hidroximetil)-4-oxo-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-3-il]oxi}pentiloxi)benzonitrilo; sin embargo, al igual que en el apartado 5.5.1.8., se emplea la misma nomenclatura que en el resto de los compuestos con el fin de compararlos con mayor facilidad.

5.5.1.17. 6-(Hidroximetil)-3-[5-(*N*-indolil)pentiloxi]-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8q**



Rendimiento: 80 %; sólido, pf: 62-64° C (acetato de etilo).

R_f: 0,4 (éter etílico:metanol, 8:2).

IR (KBr, cm⁻¹): 3402, 3215, 3051, 2926, 2852, 1655, 1641, 1593, 1439, 1311, 1194, 737.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,48-1,60 (m, 2H, CH₂), 1,74-2,10 (m, 4H, 2CH₂), 1,98 (d, *J* = 5,2 Hz, 3H, CH₃), 2,64 (sa, 1H, OH), 4,07 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂N), 4,21 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂O), 4,54 (s, 2H, CH₂OH), 6,47-6,61 (m, 3H, 2CH=, H⁵), 7,11-7,19 (m, 3H, H²_i, H³_i, H⁵_i), 7,26 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,41 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H⁷_i), 7,69 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆, δ): 18,7 (CH₃), 23,2, 29,4, 29,8, 46,1 (CH₂N), 60,8 (CH₂OH), 72,2 (CH₂O), 100,8 (C³_i), 109,1 (C⁷_i), 112,1 (C⁵), 118,5, 119,0, 120,8, 121,1, 127,6, 127,8, 134,3, 136,0, 141,7, 154,9, 165,0 (C⁶), 175,8 (C=O).

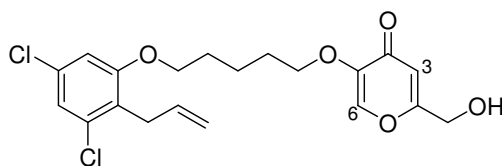
EM: 367 (M), 251, 237, 209, 185, 170, 156, 144, 130 (100), 117, 103, 77, 69, 53, 39.

Análisis Elemental de C₂₂H₂₅NO₄

Calculado: C, 71,91 %; H, 6,86 %; N, 3,81 %

Encontrado: C, 71,51 %; H, 6,92 %; N, 3,90 %

5.5.1.18. 5-[5-(2-Alil-3,5-diclorofenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **8r**



Rendimiento: 80 %; sólido, pf: 59-61° C (éter etílico).

***R_f*:** 0,1 (hexano:acetato de etilo 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3018, 2924, 1618, 1558, 1541, 1491, 1364.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,52-1,63 (m, 2H, CH₂), 1,72-1,90 (m, 4H, 2CH₂), 3,00 (sa, 1H, OH), 3,41 (sa, 2H, CH₂Ar), 3,81 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H, CH₂O), 3,83 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 4,42 (s, 2H, CH₂OH), 4,86-4,96 (m, 2H, CH₂=), 5,68-5,88 (m, 1H, CH=), 6,46 (s, 1H, H³), 6,66 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, HAr), 6,92 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, HAr), 7,51 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 22,7, 28,8, 28,9, 31,1 (CH₂Ar), 61,1 (CH₂OH), 68,6 (CH₂O), 69,8 (CH₂O), 110,7 (C³), 112,2, 115,6, 121,4, 125,6, 132,7, 134,7, 135,5, 139,8 (C⁶), 148,0 (C⁵), 158,1 (CO), 167,4 (C²), 175,0 (C=O).

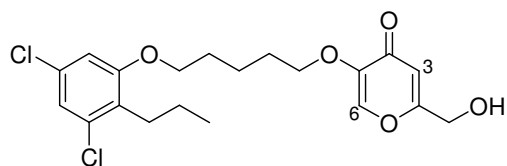
EM: 412 (M), 241, 229, 211, 169, 155, 143, 127, 113, 95, 69 (100), 55, 41.

Análisis Elemental de C₂₀H₂₂Cl₂O₅

Calculado: C, 58,12 %; H, 5,37 %.

Encontrado: C, 57,90 %; H, 5,56 %.

5.5.1.19. 5-[5-(3,5-Dicloro-2-propilfenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **8s**



Rendimiento: 90 %; sólido, pf: 77-79° C (acetato de etilo:éter etílico).

R_f : 0,2 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm^{-1}): 3367, 2958, 2930, 2870, 1635, 1602, 1558, 1458, 1394, 1236, 1211, 1051.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 0,86 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3), 1,35-1,63 (m, 4H, 2CH_2), 1,72-1,86 (m, 4H, 2CH_2), 2,62 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, CH_2Ar), 3,24 (sa, 1H, OH), 3,82 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2O), 3,87 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, CH_2O), 4,42 (s, 2H, CH_2OH), 6,48 (s, 1H, H^3), 6,63 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, HAr), 6,89 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, HAr), 7,52 (s, 1H, H^6).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 14,1 (CH_3), 21,9, 22,5, 28,7, 28,8 (CH_2Ar), 60,9 (CH_2OH), 68,3 (CH_2O), 69,7 (CH_2O), 110,4 (C^3), 112,0, 121,2, 128,3, 131,9, 135,2, 139,8 (C^6), 147,8 (C^5), 158,1 (CO), 167,5 (C^2), 174,9 ($\text{C}=\text{O}$).

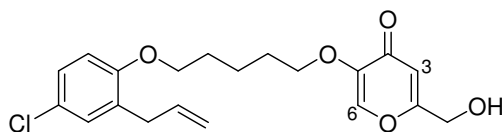
EM: 414 (M), 399, 385, 365, 273, 245, 211, 193, 175, 155, 143 (100), 95, 85, 67, 53.

Análisis Elemental de $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{O}_5$

Calculado: C, 57,84 %; H, 5,82 %.

Encontrado: C, 58,35 %; H, 6,09 %.

5.5.1.20. 5-[5-(2-Alil-4-clorofenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona, **8t**



Rendimiento: 90 %; sólido, pf: 98-100° C (éter etílico).

R_f: 0,2 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3350, 3068, 2943, 2924, 1645, 1608, 1583, 1570, 1450, 1409, 1263, 1200, 1146, 1038, 976.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,49-1,62 (m, 2H, CH₂), 1,70-1,90 (m, 4H, 2CH₂), 3,06 (sa, 1H, OH), 3,26 (sa, *J* = 6,6 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,79-3,90 (m, 4H, 2CH₂O), 4,43 (s, 2H, CH₂OH), 4,99 (m, 2H, CH₂=), 5,76-5,96 (m, 1H, CH=), 6,53 (s, 1H, H³), 6,64-6,76 (m, 1H, HAr), 7,02-7,16 (m, 2H, HAr), 7,54 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 22,6, 28,8, 29,0, 34,1 (CH₂Ar), 60,9 (CH₂OH), 68,0 (CH₂O), 69,7 (CH₂O), 111,8 (C³), 112,3, 115,9, 125,0, 126,9, 129,3, 133,0, 136,1, 139,8 (C⁶), 147,7 (C⁵), 155,0 (CO), 167,7 (C²), 174,8 (C=O).

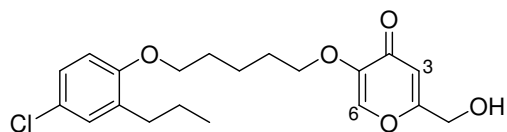
EM: 378 (M), 211, 169, 143, 127, 113, 95, 77, 69 (100), 55, 41.

Análisis Elemental de C₂₀H₂₃ClO₅

Calculado: C, 63,41 %; H, 6,12 %.

Encontrado: C, 62,25 %; H, 6,50 %.

5.5.1.21. 5-[5-(4-Cloro-2-propilfenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **8u**



Rendimiento: 91%; sólido, pf: 92-94° C (éter etílico).

R_f : 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm^{-1}): 3327, 2926, 1647, 1616, 1265, 1248, 1219.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 0,85 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3), 1,45-1,63 (m, 4H, 2CH_2), 1,71-1,81 (m, 4H, 2CH_2), 2,47 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2Ar), 2,60 (sa, 1H, OH), 3,79-3,89 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{O}$), 4,42 (s, 2H, CH_2OH), 6,47 (s, 1H, H^3), 6,62-6,67 (m, 1H, HAr), 6,98-7,04 (m, 2H, HAr), 7,50 (s, 1H, H^6).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 14,0 (CH_3), 22,6, 22,7, 28,8, 29,0, 32,1 (CH_2Ar), 61,0 (CH_2OH), 67,9 (CH_2O), 69,8 (CH_2O), 112,1 (C^3), 112,2, 125,0, 126,3, 129,6, 133,1, 139,7 (C^6), 147,8 (C^5), 155,5 (CO), 167,1 (C^2), 174,8 ($\text{C}=\text{O}$).

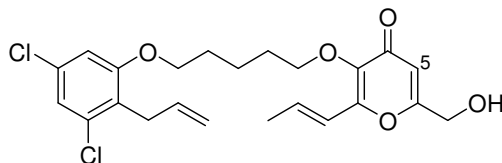
EM: 380 (M), 378, 357, 346, 211, 195, 170, 155, 143 (100), 125, 113, 95, 77, 69, 41, 39.

Análisis Elemental de $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClO}_5$

Calculado: C, 63,07 %; H, 6,62 %.

Encontrado: C, 62,67 %; H, 6,92 %.

5.5.1.22. 3-[5-(2-Alil-3,5-diclorofenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8v**



Rendimiento: 88 %; sólido, pf: 97-99° C (éter etílico).

***R_f*:** 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm⁻¹): 3414, 3221, 2930, 2852, 1643, 1599, 1560, 1439, 1232.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,78-2,21 (m, 9H, 1CH₃, 3CH₂), 2,92 (sa, 1H, OH), 3,86 (da, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂Ar), 4,16 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H, CH₂O), 4,29 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂O), 4,74 (s, 2H, CH₂OH), 5,14-5,22 (m, 2H, CH₂=), 5,98-6,12 (m, 1H, CH=), 6,80-6,90 (m, 3H, H⁵, 2CH=), 6,93 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, HAr), 7,18 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, HAr).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 18,8 (CH₃), 22,3, 28,7, 29,5, 30,8 (CH₂Ar), 60,7 (CH₂OH), 68,5 (CH₂O), 72,4 (CH₂O), 110,5 (C⁵), 112,0, 115,3, 118,6, 121,1, 126,0, 132,4, 134,4, 134,6, 134,7, 141,0, 154,9, 158,0 (CO), 166,0 (C⁶), 176,5 (C=O).

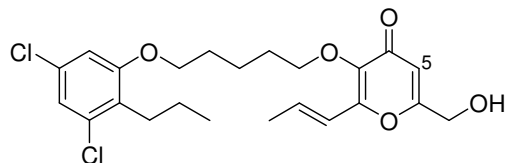
EM: 452 (M), 437, 423, 363, 251, 235, 209, 183, 167 (100), 156, 135, 121, 95, 69, 55, 39.

Análisis Elemental de C₂₃H₂₆Cl₂O₅

Calculado: C, 60,93 %; H, 5,78 %.

Encontrado: C, 60,49 %; H, 6,39 %.

5.5.1.23. 3-[5-(3,5-Dicloro-2-propilfenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8w**



Rendimiento: 25%; sólido, pf: 91-93° C (hexano:acetato de etilo).

R_f : 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR (KBr, cm^{-1}): 3414, 3221, 2930, 2852, 1643, 1599, 1560, 1439, 1232.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 0,86 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3), 1,35-1,84 (m, 8H, 4CH_2), 1,89 (d, $J = 5,4$ Hz, 3H, CH_3), 2,62 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, CH_2Ar), 3,42 (sa, 1H, OH), 3,87 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, CH_2O), 4,02 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2O), 4,46 (s, 2H, CH_2OH), 6,46-6,62 (m, 3H, $2\text{CH}_2=$, H^δ), 6,64 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, HAr), 6,89 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, HAr).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 14,2 (CH_3C), 19,0 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{}$), 22,1, 22,6, 28,9, 29,0, 29,8 (CH_2Ar), 61,0 (CH_2OH), 68,6 (CH_2O), 72,7 (CH_2O), 110,5 (C^5), 112,2, 118,8, 121,3, 128,4, 132,0, 134,9, 135,3, 141,5, 155,2, 158,2 (CO), 166,4 (C^6), 176,8 ($\text{C}=\text{O}$).

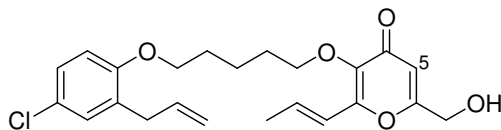
EM: 454 (M), 439, 425, 413, 273, 251, 237, 209, 183, 167, 156, 135, 111, 95, 69, 53, 41 (100).

Análisis Elemental de $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{O}_5$

Calculado: C, 60,66 %; H, 6,20 %.

Encontrado: C, 60,49 %; H, 6,39 %.

5.5.1.24. 3-[5-(2-Alil-4-clorofenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8x**



Rendimiento: 64 %; aceite amarillo.

***R_f*:** 0,2 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

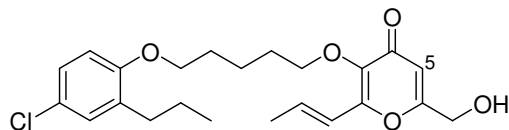
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3385, 2928, 2856, 1645, 1599, 1491, 1435, 1244.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,52-1,63 (m, 2H, CH₂), 1,72-1,86 (m, 4H, 2CH₂), 1,91 (d, *J* = 4,0 Hz, 3H, CH₃), 2,21 (sa, 1H, OH), 3,31 (da, *J* = 7,5 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,39 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H, CH₂O), 4,06 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 4,47 (s, 2H, CH₂OH), 4,98-5,10 (m, 2H, CH₂=), 5,85-5,97 (m, 1H, CH=), 6,42 (s, 1H, H⁵), 6,48-6,85 (m, 4H, 2HAr, 2CH=), 7,07 (m, 1H, HAr).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 19,0 (CH₃), 22,6, 29,1, 29,7, 34,2 (CH₂Ar), 60,9 (CH₂OH), 68,2 (CH₂O), 72,7 (CH₂O), 112,1 (C⁵), 112,4, 116,2, 118,7, 125,2, 126,9, 129,6, 130,7, 134,9, 136,2, 141,4, 155,2, 155,3 (CO), 166,4 (C⁶), 176,8 (C=O).

EM: 418 (M), 403, 363, 251, 237, 209, 195, 167, 156, 135, 115, 103, 95, 69 (100), 55, 41.

5.5.1.25. 3-[5-(4-Cloro-2-propilfenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8y**



Rendimiento: 35 %; aceite amarillo.

R_f : 0,2 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

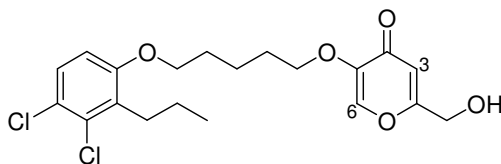
IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3350, 2923, 2852, 1647, 1599, 1551, 1437, 1242.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 0,85 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, CH_3), 1,36-1,82 (m, 8H, 4CH_2), 1,86 (d, $J = 4,9$ Hz, 3H, CH_3), 2,47 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2Ar), 3,51 (sa, 1H, OH), 3,87 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, CH_2O), 4,00 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2O), 4,42 (s, 2H, CH_2OH), 6,41 (s, 1H, H^5), 6,46-6,68 (m, 3H, 1HAr, $2\text{CH}=\text{}$), 6,80-7,04 (m, 2H, HAr).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 14,0 (CH_3C), 18,9 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{}$), 22,6, 22,9, 29,1, 29,8, 32,2 (CH_2Ar), 61,0 (CH_2OH), 68,1 (CH_2O), 72,7 (CH_2O), 112,1 (C^5), 112,3, 118,8, 125,0, 126,4, 129,7, 133,2, 134,9, 141,5, 155,2, 155,6 (CO), 166,3 (C^6), 176,6 ($\text{C}=\text{O}$).

EM: 420 (M), 405, 389, 251, 239, 209, 195, 183, 167, 141, 125, 107, 95, 69 (100), 55, 41

5.5.1.26. 5-[5-(3,4-Dicloro-2-propilfenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, **8z**



H.P.L.C.: 99,6 % de pureza.

Rendimiento: 73 %; sólido, pf: 85-86° C (acetato de etilo:éter etílico).

R_f: 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3300, 2945, 2870, 1647, 1607, 1452, 1259, 1207, 1151, 1082, 1026, 870.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,90 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 1,39-1,54 (m, 4H, 2CH₂), 1,59-1,92 (m, 4H, 2CH₂), 2,74 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,13 (sa, 1H, OH), 3,38 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂O), 3,90 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH₂O), 4,44 (s, 2H, CH₂OH), 6,51 (s, 1H, H³), 6,62 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, HAr), 7,16 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, HAr), 7,54 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 14,3 (CH₃), 21,9, 22,7, 28,9, 29,1, 30,2 (CH₂Ar), 60,9 (CH₂OH), 68,3 (CH₂O), 69,7 (CH₂O), 110,4 (C³), 111,9, 124,0, 127,5, 131,8, 132,0, 139,6 (C⁶), 147,9 (C⁵), 156,2 (CO), 169,0 (C²), 175,1 (C=O).

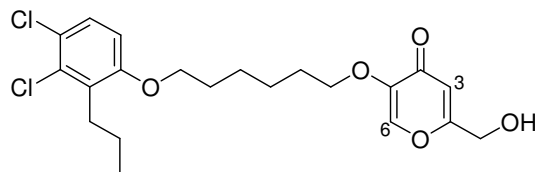
EM: 414 (M), 211, 195, 175, 153, 143, 127, 95, 85, 69 (100), 41, 39.

Análisis Elemental de C₂₀H₂₄Cl₂O₅

Calculado: C, 57,84 %; H, 5,82 %.

Encontrado: C, 57,96 %; H, 5,72 %.

5.5.1.27. 5-[6-(3,4-Dicloro-2-propilfenoxi)hexiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona,
8aa



Rendimiento: 60 %; sólido, pf: 86-87° C (acetato de etilo /éter etílico).

R_f : 0,3 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm^{-1}): 3301, 3099, 2937, 2908, 2756, 1645, 1610, 1591, 1456, 1253, 1080, 999.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 0,88 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, CH_3), 1,37-1,56 (m, 6H, 3CH_2), 1,72-1,78 (m, 4H, 2CH_2), 2,71 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2Ar), 3,04 (sa, 1H, OH), 3,79 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH_2O), 3,86 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, CH_2O), 4,42 (s, 2H, CH_2OH), 6,47 (s, 1H, H^3), 6,61 (d, $J = 9,5$ Hz, 1HAr), 7,15 (d, $J = 8,6$ Hz, 1HAr), 7,51 (s, 1H, H^6).

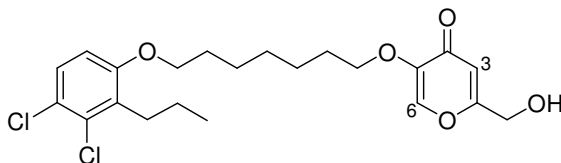
^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 14,1 (CH_3), 21,8, 25,5, 25,8, 28,9, 29,1, 30,0 (CH_2Ar), 60,9 (CH_2OH), 68,2 (CH_2O), 69,6 (CH_2O), 110,2 (C^3), 111,9, 125,1, 126,3, 127,3, 132,5, 139,3 (C^6), 147,8 (C^5), 156,7 (CO), 167,5 (C^2), 175,2 ($\text{C}=\text{O}$).

Análisis Elemental de $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{O}_5$

Calculado: C, 58,75 %; H, 6,10 %.

Encontrado: C, 58,45 %; H, 5,89 %.

5.5.1.28. 5-[7-(3,4-Dicloro-2-propilfenoxi)heptiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona,
8bb



Rendimiento: 60 %; sólido, pf: 62-64° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3238, 2937, 2854, 1653, 1638, 1616, 1585, 1459, 1263, 1217, 1149, 1076, 989.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃), 1,19-1,55 (m, 8H, 4CH₂), 1,69-1,81 (m, 4H, 2CH₂), 2,70 (dd, *J* = 7,5; 5,9 Hz, 2H, CH₂Ar), 2,98 (sa, 1H, OH), 3,77 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 3,85 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH₂O), 4,41 (s, 2H, CH₂OH), 6,45 (s, 1H, H³), 6,59 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, HAr), 7,14 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, HAr), 7,48 (s, 1H, H⁶).

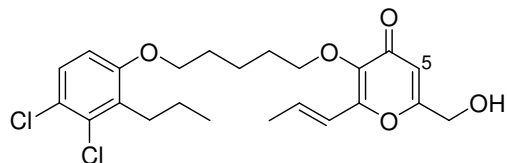
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 14,0 (CH₃), 21,7, 25,7, 25,9, 28,8, 28,9, 29,0, 29,9 (CH₂Ar), 60,8 (CH₂OH), 68,3 (CH₂O), 69,6 (CH₂O), 110,2 (C³), 111,8, 127,2, 131,6, 133,0, 139,2 (C⁶), 147,8 (C⁵), 156,0 (CO), 167,0 (C²), 174,7 (C=O).

Análisis Elemental de C₂₂H₂₈Cl₂O₅

Calculado: C, 59,60 %; H, 6,37 %.

Encontrado: C, 59,72 %; H, 6,19 %.

5.5.1.29. 3-[5-(3,4-Dicloro-2-propilfenoxi)pentiloxi]-6-(hidroximetil)-2-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-4-ona, **8cc**



Rendimiento: 75 %; sólido, pf: 75-76° C (éter etílico).

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3223, 2930, 1661, 1599, 1456, 1443, 1261, 1234, 1097, 1059, 962.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃), 1,41-1,86 (m, 8H, 4CH₂), 1,86 (dm, *J* = 5,1 Hz, 3H, CH₃), 2,72 (m, 3H, CH₂Ar, OH), 3,88 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 4,01 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂O), 4,42 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H, CH₂OH), 6,34 (s, 1H, H⁵), 6,51 (m, 2H, CH=), 6,62 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, HAr), 7,15 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, HAr).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 14,1 (CH₃C), 18,8 (CH₃C=), 21,8, 22,4, 28,9, 29,6, 30,0 (CH₂Ar), 61,1 (CH₂OH), 68,3 (CH₂O), 72,4 (CH₂O), 110,2 (C⁵), 112,4, 118,7, 124,2, 127,3, 131,7, 132,7, 134,1, 142,5, 154,5, 156,1 (CO), 164,9 (C⁶), 176,2 (C=O).

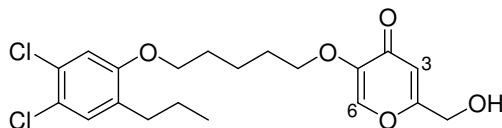
EM: 454 (M), 439, 335, 285, 273, 251, 235, 204, 183, 167, 156, 135, 111, 83, 69 (100), 55, 41.

Análisis Elemental de C₂₃H₂₈Cl₂O₅

Calculado: C, 60,66 %; H, 6,20 %.

Encontrado: C, 60,44 %; H, 6,24 %.

5.5.1.30. 5-[5-(4,5-Dicloro-2-propilfenoxi)pentiloxi]-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona,
8dd



Rendimiento: 60 %; sólido, pf: 83-84° C (acetato de etilo:éter etílico).

R_f: 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3315, 3082, 2952, 2927, 2873, 1649, 1608, 1587, 1488, 1469, 1450, 1263, 1197, 1151, 977.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,84 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃), 1,39-1,62 (m, 4H, 2CH₂), 1,72-1,98 (m, 4H, 2CH₂), 2,47 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,65 (sa, 1H, OH), 3,82-3,89 (m, 4H, 2CH₂O), 4,41 (s, 2H, CH₂OH), 6,45 (s, 1H, H³), 6,78 (s, 1H, HAr), 7,08 (s, 1H, HAr), 7,50 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 13,8 (CH₃), 22,4, 22,6, 28,6, 28,7, 31,5 (CH₂Ar), 60,8 (CH₂OH), 68,1 (CH₂O), 69,5 (CH₂O), 111,9 (C³), 113,0, 122,9, 129,5, 130,7, 131,7, 139,4 (C⁶), 147,4 (C⁵), 155,8 (CO), 167,2 (C²), 174,8 (C=O).

EM: 414 (M), 379, 273, 271, 251, 219, 211, 193, 175, 155, 143, 125, 95, 85, 69 (100), 41, 39.

Análisis elemental de C₂₀H₂₄Cl₂O₅

Calculado: C, 57,84 %; H, 5,82 %.

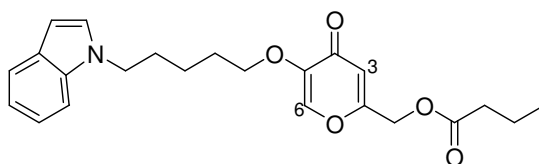
Encontrado: C, 58,05 %; H, 5,88 %.

5.6. SÍNTESIS DE ÉSTERES, **9a-f**

5.6.1. Procedimiento general

A una disolución de 1 eq. (0,62 mmol) del ácido correspondiente en CH₂Cl₂ (1 mL/mmol), se le añade otra disolución del alcohol **8i** (1,5 eq.) en CH₂Cl₂ (1 mL/mmol), bajo atmósfera de argón. La reacción se enfría a 0° C mientras se prepara una mezcla de DCC (1 eq.) y DMAP (0,1 eq.) en 10 mL de CH₂Cl₂ que se añade cuidadosamente, durante unos 5 min., agitando y manteniendo la temperatura a 0° C. Se deja que la temperatura vaya subiendo progresivamente hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agita durante toda la noche. El crudo de reacción se evapora a vacío y a continuación se diluye en acetato de etilo. La fase orgánica se lava con agua, se seca sobre MgSO₄, se filtra y evapora a vacío. Los productos finales se purifican por cromatografía en columna empleando una mezcla de hexano:acetato de etilo 1:1 como eluyente.

5.6.1.1. Butirato de {5- [5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il} metilo, **9a**



Rendimiento: 55 %; aceite.

***R_f*:** 0,1 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

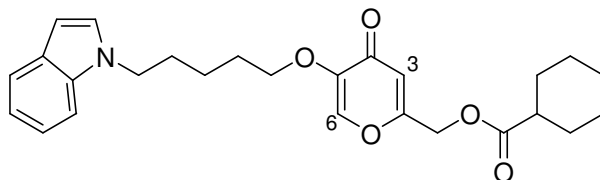
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2937, 1743, 1653, 1464, 1169.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,89 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 1,10-1,22 (m, 2H, CH₂), 1,31-1,46 (m, 2H, CH₂), 1,52-1,89 (m, 4H, 2CH₂), 2,30 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, CH₂COO), 3,68 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,06 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 4,81 (s, 2H, CH₂OCO), 6,34 (s, 1H, H³), 6,40 (d, 1H, *J* = 3,0 Hz, 1H, H³_i), 6,97-7,05 (m, 2H, HAr), 7,12 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,26 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H⁷_i), 7,39 (s, 1H, H⁶), 7,55 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 13,6 (CH₃), 18,3, 23,4, 28,7, 29,9, 35,7, 46,2 (CH₂N), 60,9 (CH₂OCO), 69,4 (CH₂O), 101,0 (C³_i), 109,3 (C⁷_i), 113,7 (C³), 119,2, 121,0, 121,4, 127,8, 128,6, 135,9, 139,4, 148,0 (C⁵), 161,6 (C²), 172,5 (COO), 174,0 (C=O).

EM: 420 (M+Na), 398 (M+1).

5.6.1.2. Ciclohexanocarboxilato de {5-[5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il}metilo **9b**



Rendimiento: 21 %; sólido, pf: 62-64° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,5 (hexano:acetato de etilo, 2:8).

IR (KBr, cm⁻¹): 3421, 2932, 2854, 1736, 1655, 1637, 1263, 1242, 1213, 748.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,20-1,47 (m, 8H, 4CH₂), 1,48-1,95 (m, 8H, 4CH₂), 2,25-2,38 (m, 1H, CHCO), 3,73 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,08 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 4,81 (s, 2H, CH₂OCO), 6,34 (s, 1H, H³), 6,41 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, H³_i), 6,99-7,05 (m, 2H, H²_i, H⁵_i), 7,11 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,27 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H⁷_i), 7,40 (s, 1H, H⁶), 7,56 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 23,3, 25,2, 25,5, 28,6, 28,8, 29,8, 42,8, 46,1 (CH₂N), 60,7 (CH₂OCO), 69,3 (CH₂O), 100,9 (C³_i), 109,2 (C⁷_i), 113,4 (C³), 119,1, 120,9, 121,2, 127,7, 135,3, 139,3, 147,2 (C⁵), 161,8 (C²), 174,1 (C=O), 180,0 (COO).

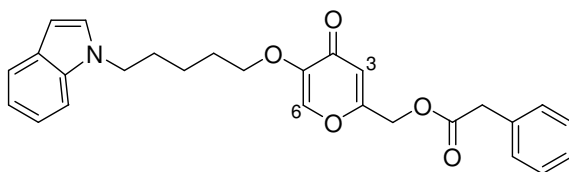
EM: 460 (M+ Na), 438 (M+1).

Análisis Elemental de C₂₆H₃₁NO₅

Calculado: C, 71,37 %; H, 7,14 %; N, 3,20 %.

Encontrado: C, 71,55 %; H, 6,77 %; N, 3,12 %.

5.6.1.3. Fenilacetato de {5-[5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il} metilo, **9c**



Rendimiento: 62 %; aceite.

R_f: 0,3 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

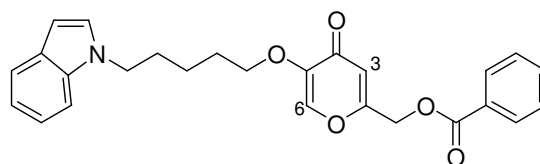
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3018, 2941, 1747, 1653, 1159.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,35-1,47 (m, 2H, CH₂), 1,68-1,90 (m, 4H, 2CH₂), 3,64 (s, 2H, CH₂COO), 3,72 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,08 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 4,83 (s, 2H, CH₂OCO), 6,30 (s, 1H, H³), 6,41 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, H³_i), 6,97-7,31 (m, 9H, HAr), 7,37 (s, 1H, H⁶), 7,56 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 23,4, 28,7, 29,9, 40,9, 46,2 (CH₂N), 61,5 (CH₂OCO), 69,5 (CH₂O), 101,0 (C³_i), 109,3 (C⁷_i), 113,9 (C³), 119,2, 121,0, 121,4, 127,5, 127,8, 128,6, 128,8, 129,3, 132,0, 135,9, 139,4, 148,0 (C⁵), 161,2 (C²), 170,0 (COO), 174,0 (C=O).

EM: 468 (M+Na), 446 (M+1).

5.6.1.4. Benzoato de {5-[5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il} metilo, **9d**



Rendimiento: 62 %; sólido, pf: 71-73° C (acetato de etilo:éter etílico).

R_f : 0,2 (cloroformo).

IR (KBr, cm^{-1}): 2920, 1730, 1718, 1649, 1626, 1601, 1452, 1261, 735, 714.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 1,32-1,47 (m, 2H, CH_2), 1,68-1,90 (m, 4H, 2CH_2), 3,73 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2N), 4,07 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH_2O), 5,07 (s, 2H, CH_2OCO), 6,40 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, H^3_i), 6,46 (s, 1H, H^3), 6,98-7,05 (m, 2H, HAr), 7,13 (td, $J = 8,2$; 1,2 Hz, 1H, H^6_i), 7,27 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H^7_i), 7,36-7,44 (m, 3H, HAr), 7,51-7,59 (m, 2H, HAr), 7,98 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, H^4_i), 8,03 (s, 1H, H^6).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 23,2, 28,5, 29,4, 46,0 (CH_2N), 61,3 (CH_2OCO), 69,2 (CH_2O), 100,8 (C^3_i), 109,2 (C^7_i), 113,5 (C^3), 119,0, 120,7, 121,2, 127,6, 128,4, 129,7, 133,6, 139,1, 148,2 (C^5), 161,6 (C^2), 174,1 ($\text{C}=\text{O}$), 181,0 (COO).

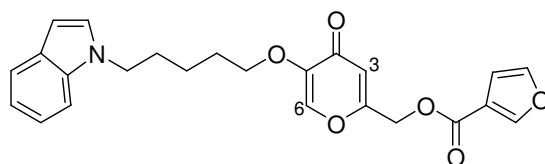
EM: 454 ($\text{M} + \text{Na}$), 433 ($\text{M} + 1$).

Análisis Elemental de $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_5$

Calculado: C, 72,37 %; H, 5,84 %; N, 3,25 %.

Encontrado: C, 72,76 %; H, 5,80 %; N, 3,07 %.

5.6.1.5. 3-Furoato de {5-[5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il} metilo, **9e**



Rendimiento: 35 %; sólido, pf: 103-105° C (acetato de etilo:éter etílico).

R_f: 0,2 (cloroformo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3329, 3086, 3057, 2932, 1720, 1649, 1628, 1315, 1165, 968, 739.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,34-1,47 (m, 2H, CH₂), 1,68-1,90 (m, 4H, 2CH₂), 3,73 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,07 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 4,99 (s, 2H, CH₂OCO), 6,40 (s, 1H, H³), 6,41 (s, 1H, H⁴_f), 6,70 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H, H³_i), 6,98-7,05 (m, 2H, HAr), 7,13 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,27 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H⁷_i), 7,39-7,42 (m, 2H, HAr), 7,55 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H⁴_i), 8,01 (d, *J* = 0,7 Hz, 1H, H²_f).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 23,2, 28,5, 29,7, 46,0 (CH₂N), 60,7 (CH₂OCO), 69,2 (CH₂O), 100,8 (C³_i), 109,1 (C⁷_i), 109,5, 113,6 (C³), 117,2, 119,0, 120,8, 121,2, 127,6, 128,4, 135,1, 139,2, 144,0, 148,3 (C⁵), 161,2 (C²), 161,3 (COO), 173,8 (C=O).

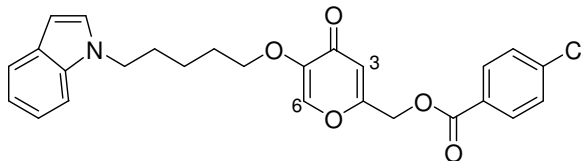
EM: 444 (M+1).

Análisis Elemental de C₂₄H₂₃NO₆

Calculado: C, 68,40 %; H, 5,53 %; N, 3,32 %.

Encontrado: C, 68,57 %; H, 5,73 %; N, 3,70 %.

5.6.1.6. 4-Clorobenzoato de {5-[5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il}metilo,
9f



Rendimiento: 55 %; sólido, pf: 215-217° C (acetato de etilo:éter etílico).

R_f : 0,2 (cloroformo:hexano, 8:2).

IR (KBr, cm^{-1}): 3113, 3092, 2951, 1718, 1645, 1626, 1283, 1261, 1109, 739.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 1,36-1,47 (m, 2H, CH_2), 1,69-1,87 (m, 4H, 2CH_2), 3,74 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2N), 4,08 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH_2O), 5,06 (s, 2H, CH_2OCO), 6,41 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, H^3_i), 6,44 (s, 1H, H^3), 6,98-7,06 (m, 2H, HAr), 7,13 (td, $J = 8,2$; 1,2 Hz, 1H, H^6_i), 7,27 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H^7_i), 7,40 (m, 3H, HAr), 7,55 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H^4_i), 7,90-7,96 (m, 2H, HAr).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 23,6, 28,3, 30,0, 45,2 (CH_2N), 61,8 (CH_2OCO), 64,9 (CH_2O), 101,2 (C^3_i), 109,5 (C^7_i), 114,1 (C^3), 119,3, 121,2, 121,6, 127,3, 129,2, 131,4, 136,1, 139,4, 147,9 (C^5), 160,8 (COO), 172,3 (C=O).

EM: 488 ($\text{M}+\text{Na}$), 466 ($\text{M}+1$).

Análisis Elemental de $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{ClNO}_5$

Calculado: C, 67,02 %; H, 5,19 %; N, 3,01 %.

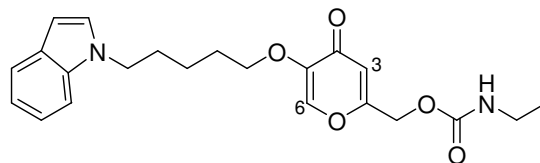
Encontrado: C, 67,35 %; H, 5,36 %; N, 3,00 %.

5.7. SÍNTESIS DE CARBAMATOS, **10a-e**

5.7.1. Procedimiento general de síntesis de alquilcarbamatos, **10a,b**

Sobre una disolución heterogénea verdosa que contiene 1 eq. del alcohol **8i**, (1,0 mmol), CuCl (1,0 mmol) y 5 mL de DMF seca se añade cuidadosamente el alquilisocianato correspondiente (1,0 mmol). Después de 15-20 min. agitando a temperatura ambiente (seguimiento de la reacción por c.c.f.), el crudo de reacción se diluye en éter etílico (20 mL), se lava con H₂O (10 mL) y una disolución saturada de NaCl (10 mL); se seca sobre MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente a vacío. Los productos finales se purifican por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo) y se cristalizan en acetato de etilo:éter de petróleo.

5.7.1.1. {5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il}metil carbamato de etilo,
10a



Rendimiento: 25 %; sólido, pf: 81-83° C.

R_f : 0,4 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm^{-1}): 3319, 3070, 2932, 2872, 1732, 1647, 1624, 1541, 1252, 741.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 1,09 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_3), 1,32-1,47 (m, 2H, CH_2), 1,67-1,90 (m, 4H, 2CH_2), 3,11-3,25 (m, 2H, CH_2NH), 3,72 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2N), 4,07 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH_2O), 4,81 (s, 3H, CH_2OCO , NH), 6,33 (s, 1H, H^3), 6,41 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, H^3_i), 6,98-7,06 (m, 2H, H^2_i , H^5_i), 7,13 (td, $J = 8,2$; 1,2 Hz, 1H, H^6_i), 7,27 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H^7_i), 7,40 (s, 1H, H^6), 7,55 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H^4_i).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 15,3 (CH_3), 23,5, 28,8, 30,1, 36,3 (CH_2NCO), 46,3 (CH_2N), 61,5 (CH_2OCO), 69,5 (CH_2O), 101,1 (C^3_i), 109,5 (C^7_i), 113,4 (C^3), 119,3, 121,1, 121,5, 127,9, 128,7, 136,0, 139,5, 148,1 (C^5), 155,0 (OCON), 161,2 (C^2), 174,3 (C=O).

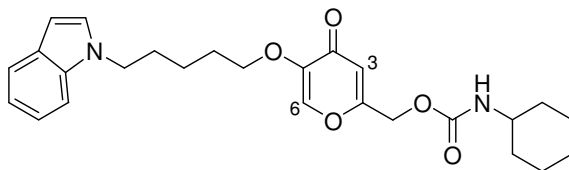
EM: 421 ($\text{M} + \text{Na}$), 399 ($\text{M} + 1$).

Análisis Elemental de $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$

Calculado: C, 66,32 %; H, 6,58 %; N, 7,03 %.

Encontrado: C, 66,23 %; H, 6,43 %; N, 7,06 %.

5.7.1.2. {5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il}metil carbamato de ciclohexilo, **10b**



Rendimiento: 77 %; sólido, pf: 78-80° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,7 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3325, 2933, 1734, 1684, 1570, 1234, 742.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 0,89-1,79 (m, 16H, 8CH₂), 3,20-3,45 (m, 1H, CHNH), 3,62 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 3,97 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 4,62 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H, NH), 4,69 (s, 2H, CH₂OCO), 6,23 (s, 1H, H³), 6,30 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, H³_i), 6,87-6,95 (m, 2H, H²_i, H⁵_i), 7,02 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,16 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H⁷_i), 7,29 (s, 1H, H⁶), 7,44 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆, δ): 23,2, 24,5, 25,2, 28,5, 29,7, 33,1, 46,0 (CH₂N), 50,1 (CHN), 60,2 (CH₂OCO), 69,2 (CH₂O), 100,8 (C³_i), 109,1 (C⁷_i), 110,4 (C³), 119,0, 120,8, 121,2, 127,6, 127,8, 136,0, 139,5, 147,0 (C⁵, OCON), 163,5 (C²), 175,0 (C=O).

EM: 475 (M+ Na), 453 (M+1).

Análisis Elemental de C₂₆H₃₂N₂O₅

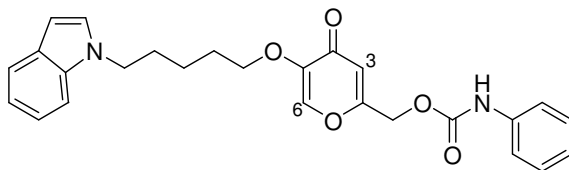
Calculado: C, 69,01 %; H, 7,13 %; N, 6,19 %.

Encontrado: C, 68,69 %; H, 7,09 %; N, 6,16 %.

5.7.2. Procedimiento general de síntesis de arilcarbamatos, **10c-e**

Sobre una disolución de 1 eq. (0,74 mmol) del correspondiente arilisocianato en 1,7 mL de THF anhidro, se añade otra disolución del alcohol **8i** en Et₃N, gota a gota. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. El crudo de reacción se evapora a vacío. Los productos finales se purifican por cromatografía en columna empleando una mezcla variable de hexano:acetato de etilo y se cristalizan en acetato de etilo:éter de petróleo.

5.7.2.1. {5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il}metil carbamato de fenilo,
10c



Rendimiento: 77 %; sólido, pf: 150° C (descompone).

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3448, 3259, 3084, 2949, 2930, 1730, 1647, 1616, 1553, 1448, 1238, 748.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,33-1,49 (m, 2H, CH₂), 1,70-1,91 (m, 4H, 2CH₂), 3,84 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,25 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂O), 5,08 (s, 2H, CH₂OCO), 6,47 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, H^{3_i}), 6,53 (s, 1H, H³), 7,02-7,21 (m, 3H, HAr), 7,32-7,61 (m, 7H, HAr), 8,21 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆, δ): 23,9, 28,0, 29,8, 45,8 (CH₂N), 61,0 (CH₂OCO), 69,9 (CH₂O), 100,5 (C^{3_i}), 109,9 (C^{7_i}), 112,7, 114,1 (C³), 119,1, 119,2, 121,3, 121,5, 124,2, 127,1, 128,8, 129,0, 138,7, 141,1 (C⁵, OCON), 174,9 (C=O).

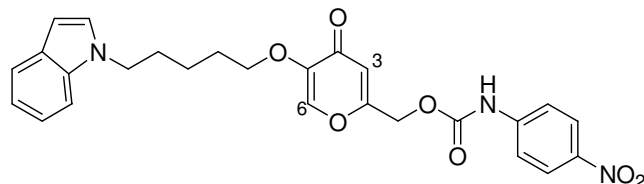
EM: 445 (M-1).

Análisis Elemental de C₂₆H₂₆N₂O₅

Calculado: C, 69,94 %; H, 5,87 %; N, 6,27 %.

Encontrado: C, 69,76 %; H, 5,80 %; N, 6,07 %.

5.7.2.2. {5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il}metil carbamato de *p*-nitrofenilo, **10d**



Rendimiento: 30 %; sólido, pf: 135-137° C.

***R*_f:** 0,6 (acetato de etilo).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3377, 1709, 1653, 1514, 1337.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,30-1,43 (m, 2H, CH₂), 1,72-1,82 (m, 4H, 2CH₂), 3,75 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂N), 4,08 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 5,34 (s, 2H, CH₂OCO), 6,40 (s, 1H, H³), 6,49 (sa, 1H, H³_i), 7,01-7,12 (m, 3H, HAr), 7,25-7,27 (m, 2H, HAr), 7,45-7,60 (m, 3H, 2HAr, H⁶), 7,80 (sa, 1H, NH), 8,10-8,15 (m, 2H, HAr).

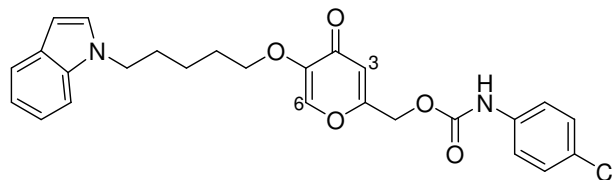
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 23,4, 28,7, 30,0, 46,3 (CH₂N), 69,4 (CH₂OCO), 101,1 (C³_i), 109,1 (C⁷_i), 119,3 (C³), 121,1 (4C), 121,5, 124,7, 127,5, 128,0, 135,0, 139,1, 144,6 o 147,8 (C⁵ o OCON), 161,0 (C²), 173,6 (C=O).

Análisis Elemental de C₂₆H₂₅N₃O₇

Calculado: C, 63,54 %; H, 5,13 %; N, 8,55 %.

Encontrado: C, 63,45 %; H, 4,97 %; N, 8,25 %.

5.7.2.3. {5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il}metil carbamato de *p*-clorofenilo, **10e**



Rendimiento: 30 %; sólido, pf: 170-171° C.

***R_f*:** 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3448, 3286, 2932, 1734, 1701, 1655, 1549, 1271, 1243.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃:DMSO-d₆, δ): 1,30-1,50 (m, 2H, CH₂), 1,68-1,96 (m, 4H, 2CH₂), 3,74 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,08 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂O), 4,92 (s, 2H, CH₂OCO), 6,38 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, H³_i), 6,43 (s, 1H, H³), 6,95-7,50 (m, 9H, HAr), 7,54 (s, 1H, H⁶), 9,44 (sa, 1H, NH).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃:DMSO-d₆, δ): 23,4, 28,7, 29,7, 29,9, 46,2 (CH₂N), 61,8 (CH₂OCO), 69,4 (CH₂O), 101,0 (C³_i), 109,5 (C⁷_i), 113,8 (C³), 119,2, 120,0, 120,9, 121,4, 127,8, 129,2, 139,4, 148,1 (C⁵, OCON), 160,2 (C²), 174,0 (C=O).

EM: 503 (M+ Na), 481 (M+1).

Análisis Elemental de C₂₆H₂₅ClN₂O₅

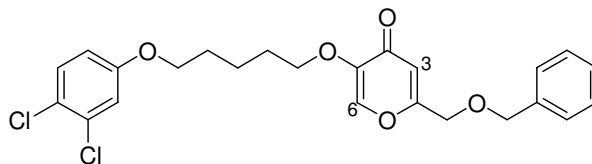
Calculado: C, 64,93 %; H, 5,24 %; N, 5,82 %.

Encontrado: C, 64,94 %; H, 5,15 %; N, 5,84 %.

5.8. SÍNTESIS DE BENCILÉTERES, **11a-c**

5.8.1. Síntesis de 2-(benciloximetil)-5-[5-(3,4-diclorofenoxi)pentiloxi]-4*H*-piran-4-ona, **11a**

A una disolución de 1 mmol de **8d** en 15 mL de THF anhidro, bajo atmósfera de argón y a 0° C, se le añaden cuidadosamente 1,5 mmol de NaH (60 % en aceite mineral). La mezcla se agita durante 30 minutos y a continuación se añaden 0,17 mL (1,5 eq.) de bromuro de bencilo y 6 mg de Bu₄NI. Se agita durante toda la noche dejando que la temperatura suba progresivamente de 0° C a temperatura ambiente. El crudo de reacción se hidroliza con una disolución saturada de NH₄Cl y se extrae con éter etílico (3 × 10mL). Las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO₄, se filtran y el disolvente se elimina a vacío. El producto final se purifica por cromatografía en columna, empleando una mezcla variable de hexano:acetato de etilo como eluyente.



Rendimiento: 52 %; sólido, pf: 82-83° C (acetato de etilo:éter etílico).

R_f: 0,3 (hexano:acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3257, 3128, 3064, 2906, 1651, 1627, 1596, 1481, 1465, 1263, 999, 835, 740.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,46-1,60 (m, 2H, CH₂), 1,67-1,71 (m, 4H, 2CH₂), 3,76-3,87 (m, 4H, 2CH₂O), 4,22 (s, 2H, CH₂O), 4,51 (s, 2H, CH₂O), 6,41 (s, 1H, H³), 6,64 (dd, *J* = 8,9; 2,9 Hz, 1H, HAr), 6,88 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H, HAr), 7,16-7,33 (m, 6H, HAr), 7,48 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 22,6, 28,9 (2C), 67,7 (CH₂O), 68,4 (CH₂O), 69,7 (CH₂O), 73,3 (CH₂O), 113,7 (C³), 114,7, 116,5, 123,8, 128,0 (2C), 128,3, 128,7 (2C), 130,8, 132,9, 137,0, 139,6, 148,1, 158,2 (CO), 164,0 (C²), 174,4 (C=O).

Análisis Elemental de C₂₄H₂₄Cl₂O₅

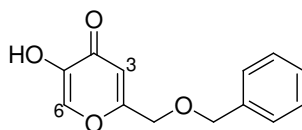
Calculado: C, 62,14 %; H, 5,18 %.

Encontrado: C, 61,88 %; H, 5,13%.

5.8.2. Síntesis de 5-[5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]-2-[(benciloxi)metil]-4*H*-piran-4-ona, **11c**

5.8.2.1. 2-[(Benciloxi)metil]-5-hidroxi-4*H*-piran-4-ona, **11b**

En un matraz de fondo redondo y bajo atmósfera de argón, se introducen 0,250 g (1,76 mmol) de ácido kójico, 2 mL de CH₂Cl₂ anhidro y 2,22 g de 2,2,2-tricloroacetimidato de bencilo (3,57 mmol). La mezcla de reacción se enfría con un baño de agua-hielo y se añaden 10 µL (0,07 mmol) de ácido triflico recién destilado, gota a gota. Una vez adicionado todo el catalizador ácido se retira el baño de hielo y se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente. Después se calienta a 40-45° C y se agita durante toda la noche. El crudo de reacción se concentra a vacío y el producto intermedio, **11b**, se purifica por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo).



Rendimiento: 22 %; aceite incoloro.

R_f: 0,2 (hexano:acetato de etilo, 3:1)

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3429, 3018, 2924, 1630, 1454.

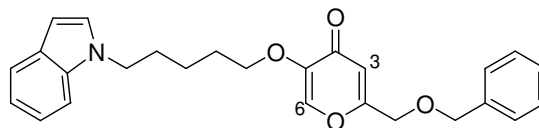
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 3,72 (sa, 1H, OH), 4,27 (s, 2H, CH₂O), 4,54 (s, 2H, OCH₂Ph), 6,50 (s, 1H, H³), 7,27 (sa, 5H, ArH), 7,75 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 67,6 (CH₂O), 73,2 (CH₂O), 110,4 (C³), 127,7, 128,1, 128,5, 128,7, 137,5, 145,6 (C⁶), 165,4 (C²), 174,5 (C=O).

EM: 255 (M+Na), 233 (M+1).

5.8.2.2. 5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-2-[(benciloxi)metil]-4*H*-piran-4-ona, **11c**

En un matraz de fondo redondo provisto de un agitador magnético y bajo atmósfera de argón se introducen 80 mg (0,34 mmol) de **11b** y 90 mg (0,34 mmol) de 1-(5-bromopentil)-1*H*-indol, **4i**. A continuación se añaden 169 mg (0,52 mmol) de Cs₂CO₃, una punta de espátula de NaI y 2 mL de DMF. La mezcla de reacción se calienta a 80° C y se agita durante 3 horas. El crudo de reacción se filtra y se evapora el disolvente. El producto final se purifica por cromatografía en columna, empleando una mezcla 1:1 de hexano:acetato de etilo como eluyente.



Rendimiento: 45 %, aceite amarillento.

R_f: 0,3 (acetato de etilo).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3018, 2926, 1709, 1653, 1624.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,18-1,45 (m, 2H, CH₂), 1,66-1,96 (m, 4H, 2CH₂), 3,71 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,02 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂O), 4,22 (s, 2H, CH₂O), 4,51 (s, 2H, CH₂O), 6,39-6,41 (m, 2H, H³, HAr), 6,97-7,36 (m, 9H, HAr), 7,38 (s, 1H, H⁶), 7,54 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H⁴).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 23,8, 29,1, 30,4, 46,6 (CH₂N), 67,9 (CH₂O), 69,7 (CH₂O), 73,6 (CH₂O), 101,4 (C³_i), 109,8 (C⁷_i), 113,9 (C³), 119,6, 121,4, 121,8, 128,3, 128,6, 128,9, 129,0, 136,3, 137,2, 139,7, 148,3 (C⁵), 150,2, 164, (C²), 174,7 (C=O).

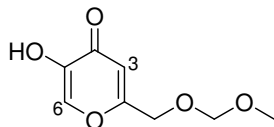
EM: 440 (M+Na), 418 (M+1).

5.9. SÍNTESIS DE ACETALES, **12c,d**

5.9.1. Procedimiento general de transacetalación

En un matraz de fondo redondo provisto de un embudo de adición relleno de tamices moleculares de 4 Å (aproximadamente 2 g) y bajo atmósfera de argón, se introducen 1 eq. de ácido kójico (1g, 7 mmol), 4 mL de CH₂Cl₂ anhidro, 10 mmol del correspondiente acetal y 0,07 mmol de ácido *p*-toluensulfónico (PTSA). La mezcla de reacción se agita a reflujo durante toda la noche, después se enfría y se lava con una disolución saturada de Na₂CO₃. La fase acuosa se lava con CH₂Cl₂, las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran a presión reducida. Los productos se purifican por cromatografía en columna, empleando una mezcla de hexano:acetato de etilo como eluyente.

5.9.1.1. 5-Hidroxi-2-[(metoximetoxi)metil]-4*H*-piran-4-ona, **12a**



Rendimiento: 10 %; sólido blanco.

R_f: 0,3 (hexano:acetato de etilo, 3:1).

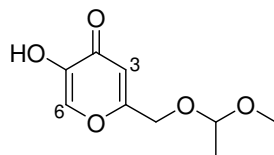
IR (KBr, cm⁻¹): 3250, 3097, 2797, 1653, 1614, 1589, 1452, 1416, 1271, 1203, 1155, 1053, 974, 914.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 3,33 (s, 3H, CH₃O), 4,34 (s, 2H, CH₂O), 4,64 (s, 2H, OCH₂O), 6,48 (sa, 2H, OH, H³), 7,77 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 55,7 (CH₃O), 64,9 (CH₂O), 96,2 (OCH₂O), 110,4 (C³), 137,5 (C⁵), 145,6 (C⁶), 165,4 (C²), 174,0 (C=O).

EM: 209 (M+Na), 187 (M+1).

5.9.1.2. (±) 5-Hidroxi-2-[(1-metoxietoxi)metil]-4H-piran-4-ona, **12b**



Rendimiento: 6 %; sólido amarillento.

R_f : 0,3 (hexano:acetato de etilo, 3:1).

IR (KBr, cm^{-1}): 3275, 3080, 2924, 1647, 1618, 1583, 1458, 1259, 1140, 906.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 1,29 (d, $J = 5,3$ Hz, 3H, CH_3), 3,26 (s, 3H, CH_3O), 4,31 (d, $J = 3,8$ Hz, 2H, CH_2O), 4,72 (q, $J = 5,3$ Hz, 1H, OCHO), 6,27 (sa, 1H, OH), 6,49 (s, 1H, H^3), 7,76 (s, 1H, H^6).

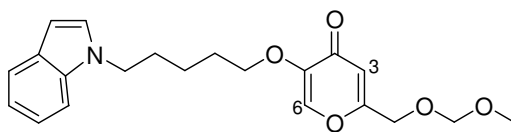
^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 19,3 (CH_3), 52,5 (CH_3O), 62,3 (CH_2O), 85,3 (OCHO), 100,4 (C^3), 137,3 (C^5), 145,0 (C^6), 162,8 (C^2), 173,5 ($\text{C}=\text{O}$).

EM: 200 (M).

5.9.2. Procedimiento general de alquilación

En un matraz de fondo redondo y bajo atmósfera de argón, se introducen 1 eq. (0,4 mmol) de **4i**, 0,4 mmol del correspondiente acetal del ácido kójico (**12a,b**), 0,90 mmol de Cs_2CO_3 y 4 mL de DMF. La mezcla de reacción se agita a 80°C durante unas 2 horas aproximadamente (la reacción se sigue por c.c.f.). La mezcla resultante se purifica por cromatografía en columna, empleando hexano como eluyente y aumentando progresivamente la polaridad con acetato de etilo.

5.9.2.1. 5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-2-[(metoximetoxi)metil]-4*H*-piran-4-ona, **12c**



Rendimiento: 87 %; aceite amarillento.

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo).

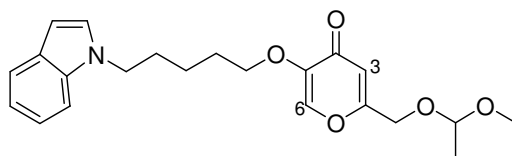
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2947, 1653, 1624, 1464, 1450, 1053.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,30-1,45 (m, 2H, CH₂), 1,60-1,88 (m, 4H, 2CH₂), 3,31 (s, 3H, CH₃O), 3,70 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,05 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 4,27 (s, 2H, CH₂O), 4,61 (s, 2H, OCH₂O), 6,38-6,40 (m, 2H, H³, H³_i), 6,96-7,04 (m, 2H, H²_i, H⁵_i), 7,12 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,25 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H⁷_i), 7,39 (s, 1H, H⁶), 7,54 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 23,3, 28,6, 29,6, 46,1 (CH₂N), 55,6 (CH₃O), 64,6 (CH₂O), 69,3 (CH₂O), 96,1 (OCH₂O), 100,9 (C³_i), 109,2 (C⁷_i), 113,3 (C³), 119,1, 120,8, 121,3, 127,7, 128,5, 135,8, 139,4, 147,8 (C⁵), 163,6 (C²), 174,2 (C=O).

EM: 394 (M+Na), 372 (M+1).

5.9.2.2. (±)-5-[(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-2-[(1-metoxietoxi)metil]-4*H*-piran-4-ona, **12d**



Rendimiento: 83 %; aceite amarillento.

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2937, 1653, 1622, 1464, 1155, 1090.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,28 (d, *J* = 5,4 Hz, 3H, CH₃), 1,35-1,54 (m, 2H, CH₂), 1,68-1,90 (m, 4H, 2CH₂), 3,25 (s, 3H, CH₃O), 3,73 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,08 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂O), 4,27 (d, *J* = 5,4 Hz, 2H, CH₂O), 4,70 (q, *J* = 5,4 Hz, 1H, OCHO), 6,41-6,42 (m, 2H, H³, H^{3_i}), 6,99-7,05 (m, 2H, H^{2_i}, H^{5_i}), 7,13 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H^{6_i}), 7,27 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H^{7_i}), 7,41 (s, 1H, H⁶), 7,56 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H^{4_i}).

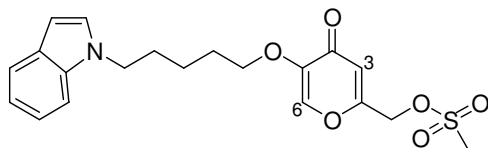
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 19,2 (CH₃), 23,8, 29,1, 30,3, 46,6 (CH₂N), 52,8 (CH₃O), 62,5 (CH₂O), 69,7 (CH₂O), 100,7 (OCHO), 101,4 (C^{3_i}), 109,7 (C^{7_i}), 113,5 (C³), 119,6, 121,3, 121,8, 128,2, 128,9, 136,3, 139,6, 148,3 (C⁵), 164,7 (C²), 174,8 (C=O).

EM: 408 (M+Na), 386 (M+1).

5.10. SÍNTESIS DE AMINAS, **13b-f**

5.10.1. Síntesis de metanosulfonato de {5-[5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-il}metilo, **13a**

En un matraz provisto de un agitador magnético y bajo atmósfera de argón, se introduce una disolución 0,2 M del alcohol **8i** en CH₂Cl₂ recién destilado sobre CaH₂ (0,92 mmol en 4,6 mL). Se enfría el matraz a 0° C y se añaden 1,38 mL de Et₃N, también destilada sobre CaH₂. La mezcla de reacción se mantiene a 0° C durante 15 minutos y pasado ese tiempo se añade lentamente, durante otros 15 min., 1 mmol de cloruro de mesilo. El matraz se tapa de la luz y se deja agitando, siguiendo la reacción por c.c.f. (2-3 h). Una vez que ha desaparecido el alcohol de partida se trasvasa el crudo de reacción a un embudo de decantación, arrastrando con un poco más de CH₂Cl₂ y se extrae con agua helada (~ 5 mL). La fase orgánica se lava con HCl al 10 % (2 × 5 mL), NaHCO₃ (2 × 5 mL) y finalmente con una disolución saturada de NaCl (2 × 5 mL). Se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra a vacío. El mesilato **13a** se emplea sin purificación posterior para la obtención de las correspondientes aminas.



Rendimiento: 53 %; aceite.

R_f: 0,4 (cloruro de metileno).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2941, 2874, 1655, 1624, 1595, 1512, 1464, 1364, 1178, 960.

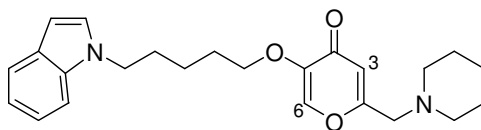
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,31-1,47 (m, 2H, CH₂), 1,68-1,90 (m, 4H, 2CH₂), 3,03 (s, 3H, CH₃), 3,73 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,08 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 4,90 (s, 2H, CH₂SO₃), 6,41-6,43 (m, 2H, H³, H³_i), 6,99-7,06 (m, 2H, H²_i, H⁵_i), 7,13 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,27 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H⁷_i), 7,44 (s, 1H, H⁶), 7,56 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 23,4, 28,7, 30,0, 38,4 (CH₃), 46,2 (CH₂N), 65,2 (CH₂OSO₃), 69,5 (CH₂O), 101,1 (C³_i), 109,4 (C⁷_i), 115,4 (C³), 119,3, 121,0, 121,5, 127,9, 128,7, 138,0, 139,6, 150,0 (C⁵), 158,8 (C²), 174,2 (C=O).
EM: 428,1 (M+Na), 406,1 (M+1).

5.10.2. Procedimiento general de obtención de aminas, **13b-f**

En un matraz con agitador magnético y bajo atmósfera de argón, se introducen 0,93 mmol de **13a** recién preparado y 0,93 mmol de la amina correspondiente recién destilada sobre CaH₂ en 1 mL de CH₂Cl₂ destilado sobre CaH₂. La mezcla de reacción se calienta a 45° C y se sigue por c.c.f. (2-4 horas). El crudo de reacción se lava con una disolución saturada de NaCl, la fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se concentra a vacío y el producto final se purifica por cromatografía en columna (CH₂Cl₂/CH₂Cl₂:MeOH), con gel de sílice previamente lavada con Et₃N.

5.10.2.1. 5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-2-[(piperidino)metil]-4*H*-piran-4-ona, **13b**



Rendimiento: 37 %; aceite amarillo.

R_f: 0,2 (cloruro de metileno).

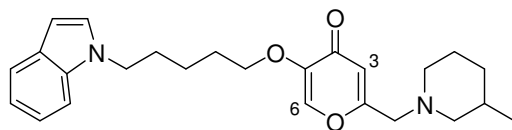
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2939, 2858, 2806, 2245, 1647, 1620, 1464.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1,46-1,41 (m, 4H, 2CH₂), 1,60-1,63 (m, 4H, 2CH₂), 1,81-1,91 (m, 4H, 2CH₂), 2,43-2,46 (m, 4H, 2CH₂N), 3,26 (s, 2H, CH₂N), 3,81 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂N), 4,15 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 6,44 (s, 1H, H³), 6,49 (sa, 1H, H³_i), 7,09-7,14 (m, 2H, H²_i, H⁵_i), 7,21 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,36 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H⁷_i), 7,51 (s, 1H, H⁶), 7,65 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 23,8, 24,3, 26,2 (2C), 29,1, 30,4, 46,6 (CH₂N), 55,0 (CH₂N), 60,7 (2C, 2CH₂N), 69,7 (CH₂O), 101,4 (C³_i), 109,7 (C⁷_i), 115,1 (C³), 119,6, 121,3, 121,8, 128,2, 129,0, 136,3, 139,9, 148,2 (C⁵), 159,9 (C²), 169,3 (C=O).

EM: 417 (M+Na), 395 (M+1).

5.10.2.2. (±)-5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-2-[(3-metilpiperidino)metil]-4*H*-piran-4-ona,
13c



Rendimiento: 45 %; aceite.

***R_f*:** 0,2 (cloruro de metileno).

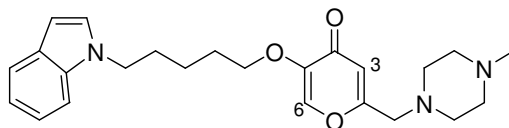
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2930, 1647, 1618, 1464, 1315, 1250.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,78 (d, *J* = 5,8 Hz, 3H, CH₃), 1,32-1,94 (m, 13H, 5CH₂, 2CHN, 1CH), 2,67-2,76 (m, 2H, 2CHN), 3,24 (s, 2H, CH₂N), 3,73 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH₂N), 4,07 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂O), 6,35 (s, 1H, H³), 6,41 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, H³_i), 6,98-7,06 (m, 2H, H²_i, H⁵_i), 7,13 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,27 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H⁷_i), 7,43 (s, 1H, H⁶), 7,55 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 19,7 (CH₃), 23,5, 25,5, 28,8, 30,1, 31,2 (CH), 32,6, 46,3 (CH₂N), 54,2 (CH₂N), 60,1 (CH₂N), 62,1 (CH₂N), 69,4 (CH₂O), 101,1 (C³_i), 109,4 (C⁷_i), 114,7 (C³), 119,3, 121,1, 121,5, 126,9, 128,7, 136,0, 139,7, 147,9 (C⁵), 165,0 (C²), 174,6 (C=O).

EM: 431 (M+Na), 409 (M+1).

5.10.2.3. 5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-2-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-4*H*-piran-4-ona,
13d



Rendimiento: 44 %; aceite.

R_f: 0,2 (cloruro de metileno).

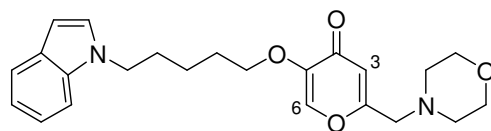
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2943, 2806, 1649, 1618, 1458, 1375.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 1,31-1,42 (m, 2H, CH₂), 1,65-1,82 (m, 4H, 2CH₂), 2,2 (s, 3H, CH₃N), 3,38 (sa, 4H, 2CH₂N), 2,46 (sa, 4H, 2CH₂N), 3,27 (s, 2H, CH₂N), 3,71 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH₂N), 4,05 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH₂O), 6,35 (s, 1H, H³), 6,38 (d, *J* = 3,0 Hz, H³_i), 7,95-7,01 (m, 2H, H²_i, H⁵_i), 7,16 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,22 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H⁷_i), 7,39 (s, 1H, H⁶), 7,53 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ): 23,8, 29,1, 30,3, 46,4 (CH₂N), 46,6(CH₃N), 53,5 (CH₂N), 55,3 (CH₂N), 59,7 (CH₂N), 69,7 (CH₂O), 101,0 (C³_i), 109,7 (C⁷_i), 115,0 (C³), 119,6, 121,3, 121,8, 128,2 (2C), 129,0, 139,9, 148,2 (C⁵), 164,8 (C²), 174,8 (C=O).

EM: 432 (M+Na), 410 (M+1).

5.10.2.4. 5-[5-(1*H*-Indol-1-il)pentiloxi]-2-[(morfolino)metil]-4*H*-piran-4-ona, **13e**



Rendimiento: 51 %; aceite amarillento.

***R_f*:** 0,2 (cloruro de metileno).

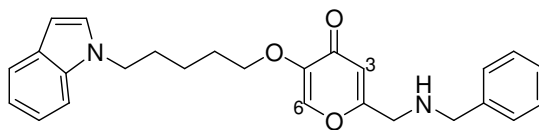
IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2930, 2864, 1649, 1618, 1464, 1454.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,40-1,47 (m, 2H, CH₂), 1,68-1,87 (m, 4H, 2CH₂), 2,42-2,47 (m, 4H, 2CH₂N), 3,28 (s, 2H, CH₂N), 3,63-3,76 (m, 6H, 2CH₂O, CH₂N), 4,08 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂O), 6,38 (s, 1H, H³), 6,41 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, H³_i), 6,98-7,06 (m, 2H, H²_i, H⁵_i), 7,13 (td, *J* = 8,2; 1,2 Hz, 1H, H⁶_i), 7,22 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H⁷_i), 7,42 (s, 1H, H⁶), 7,56 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H⁴_i).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 22,6, 28,8, 30,1, 45,2 (CH₂N), 56,7 (2CH₂N), 60,0 (CH₂N), 66,9 (2CH₂O), 69,8 (CH₂O), 101,1 (C³_i), 109,4 (C⁷_i), 115,0 (C³), 119,3, 121,5, 121,7, 126,7, 136,0, 139,8, 157,0 (C⁵), 164,5 (C²), 175,0 (C=O).

EM: 419 (M+Na), 397 (M+1).

5.10.2.5. 2-[(Bencilamino)metil]-5-[5-(1*H*-indol-1-il)pentiloxi]-4*H*-piran-4-ona, **13f**



Rendimiento: 37 %; aceite amarillento.

***R_f*:** 0,2 (cloruro de metileno).

IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3402, 3018, 2939, 1709, 1649, 1543, 1464.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,40-1,48 (m, 2H, CH₂), 1,72-1,87 (m, 4H, 2CH₂), 3,65 (s, 2H, CH₂), 3,70-3,76 (m, 4H, 2CH₂N), 4,04 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂O), 6,37 (s, 1H, H³), 6,41 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, H³ⁱ), 6,98-7,25 (m, 9H, HAr), 7,40 (s, 1H, H⁶), 7,55 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H⁴ⁱ).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 23,3, 28,6, 29,9, 46,1 (CH₂N), 49,5 (CH₂N), 52,7 (CH₂N), 69,3 (CH₂O), 100,9 (C³ⁱ), 109,2 (C⁷ⁱ), 113,4 (C³), 119,1, 120,9, 121,3, 127,3, 127,7, 128,0 (2C), 128,5 (2C), 139,4, 139,5, 146,1 (C⁵), 165,0 (C²), 174,0 (C=O).

EM: 439 (M+Na), 417 (M+1).

5.11. SÍNTESIS DE ÁCIDOS, **14a-k** Y DE LA AMIDA **15**

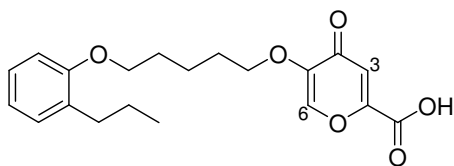
5.11.1. Procedimiento general de síntesis de ácidos

A una disolución de 1 eq. (0,43 mmol) de las correspondientes hidroximetil-4H-piran-4-onas **8** en acetona (10 mL/mmol) se le añaden 2 eq. de reactivo de Jones (0,9 M, 0,86 mmol) gota a gota. La reacción se calienta a 50° C y se adiciona 1 eq. más de reactivo de Jones, también gota a gota (0,43 mmol). La mezcla de reacción se agita mientras alcanza la temperatura ambiente (durante 5-7 horas) y a continuación se le añaden 2,3 mL de alcohol isopropílico y se agita durante 12 horas. El precipitado verde se separa por filtración y el disolvente se evapora a vacío. El residuo sólido se lava con agua y se seca a vacío a 50° C. Los crudos de reacción se purifican por cristalización para obtener los correspondientes ácidos carboxílicos.

Preparación del reactivo de Jones 0,9 N

En un matraz aforado de 10 mL se mezclan 890 mg de trióxido de cromo y 0,76 mL de ácido sulfúrico concentrado a 0° C. Se enrasa con agua destilada.

5.11.1.1. Ácido 5-[5-(2-propilfenoxi)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-carboxílico, **14a**



Rendimiento: 56 %; sólido, pf: 145-146° C (acetato de etilo).

***R_f*:** 0,4 (acetato de etilo)

IR (KBr, cm⁻¹): 3443, 2957, 2932, 2573, 2437, 1732, 1635, 1601, 1572, 1242, 1207, 935, 760.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 0,86 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 1,00-1,21 (m, 4H, 2CH₂), 1,43-1,82 (m, 4H, 2CH₂), 2,47-2,55 (m, 2H, CH₂Ar), 3,85-4,00 (m, 4H, 2CH₂O), 6,79-6,93 (m, 3H, H³, 2HAr), 7,08-7,18 (m, 2H, HAr), 8,20 (s, 1H, H⁶).

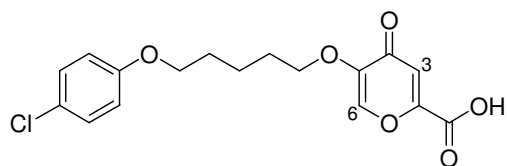
¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆, δ): 14,0 (CH₃), 22,3, 22,7, 28,3, 28,6, 31,8 (CH₂Ar), 67,3 (CH₂O), 69,0 (CH₂O), 111,5, 117,0, 120,1, 127,1, 129,7, 130,2, 140,7, 148,7, 152,8 (C²), 156,5 (CO), 161,0 (COOH), 173,0 (C=O).

Análisis Elemental de C₂₀H₂₄O₆

Calculado: C, 66,65 %; H, 6,71 %.

Encontrado: C, 66,34 %; H, 6,65 %.

5.11.1.2. Ácido 5-[5-(4-clorofenoxi)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-carboxílico, **14b**



Rendimiento: 57 %; sólido, pf: 154-156° C (metanol).

R_f : 0,3 (acetato de etilo)

IR (KBr, cm^{-1}): 3402, 2947, 2876, 1732, 1602, 1578, 1493, 1477, 1283, 1242, 1209.

^1H -RMN (200 MHz, DMSO-d_6 , δ): 1,51-1,68 (m, 2H, CH_2), 1,75-1,88 (m, 4H, 2CH_2), 3,95 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2O), 4,05 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, CH_2O), 6,99 (s, 1H, H^3), 7,03 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, HAr), 7,38 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, HAr), 8,35 (s, 1H, H^6).

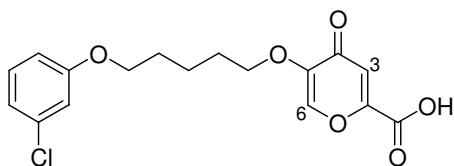
^{13}C -RMN (50 MHz, DMSO-d_6 , δ): 22,0, 28,2 (2C), 67,7 (CH_2O), 68,5 (CH_2O), 116,1, 116,9, 124,0, 129,1, 140,6, 148,4, 152,2 (C^2), 157,9 (CO), 160,7 (COOH), 172,6 ($\text{C}=\text{O}$).

Análisis Elemental de $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClO}_6$

Calculado: C, 57,84 %; H, 4,82 %.

Encontrado: C, 57,61 %; H, 5,01 %.

5.11.1.3. Ácido 5-[5-(3-clorofenoxi)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-carboxílico, **14c**



Rendimiento: 60 %; sólido, pf: 169-171° C (metanol).

IR (KBr, cm⁻¹): 3439, 2941, 2912, 1733, 1635, 1601, 1576, 1284, 1232, 1209.

R_f: 0,3 (acetato de etilo)

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,56-1,64 (m, 2H, CH₂), 1,73-1,83 (m, 4H, 2CH₂), 3,76 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 3,88 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 6,91-6,97 (m, 4H, H³, 3HAr), 7,34 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, HAr), 8,31 (s, 1H, H⁶).

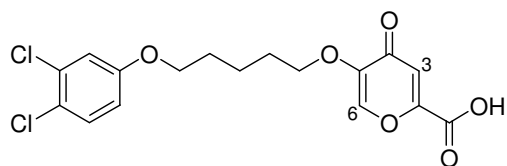
¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆, δ): 21,9, 28,1 (2C), 67,7 (CH₂O), 68,8 (CH₂O), 113,5, 114,3, 116,9, 120,3, 130,7, 133,6, 140,5, 148,5, 152,3 (C²), 159,5 (CO), 160,7 (COOH), 172,8 (C=O).

Análisis Elemental de C₁₇H₁₇ClO₆

Calculado: C, 57,84 %; H, 4,82 %.

Encontrado: C, 58,05 %; H, 5,09 %.

5.11.1.4. Ácido 5-[5-(3,4-diclorofenoxi)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-carboxílico, **14d**



Rendimiento: 55% sólido; pf: 159-161° C (acetato de etilo:hexano).

R_f : 0,3 (acetato de etilo)

IR (KBr, cm^{-1}): 3473, 2874, 2345, 1732, 1637, 1602, 1569, 1471, 1282, 1207.

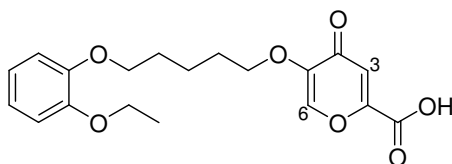
^1H -RMN (300MHz, DMSO- d_6 , δ): 1,49-1,55 (m, 2H, CH_2), 1,68-1,77 (m, 4H, 2CH_2), 3,86 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2O), 3,99 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2O), 6,89 (s, 1H, H^3), 6,94 (dd, $J = 8,7$; 3,0 Hz, 1H, HAr), 7,21 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H, HAr), 7,48, (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, HAr), 8,26 (s, 1H, H^6).

^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6 , δ): 21,7, 27,9 (2C), 68,0 (CH_2O), 68,6 (CH_2O), 115,3, 116,0, 116,7, 122,0, 130,7, 131,3, 140,4, 148,4, 152,1 (C^2), 157,9 (CO), 160,6 (COOH), 172,7 ($\text{C}=\text{O}$).

Análisis Elemental de $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_6$

Calculado: C, 52,73 %; H, 4,16 %.

Encontrado: C, 52,59 %; H, 4,21 %.



Rendimiento: 75 %; sólido, pf: 141-142° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo)

IR (KBr, cm⁻¹): 3385, 2941, 2876, 1732, 1637, 1603, 1576, 1506, 1254.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 1,47 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, CH₃), 1,61-1,81 (m, 2H, CH₂), 1,82-2,03 (m, 4H, 2CH₂), 4,02-4,21 (m, 6H, 3CH₂O), 7,00-7,15 (m, 5H, 4HAr, H³), 8,45 (s, 1H, H⁶).

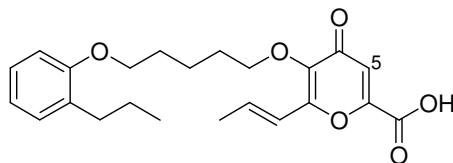
¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆, δ): 14,6 (CH₃), 21,9, 27,9, 28,2, 63,6 (CH₂O), 68,1 (CH₂O), 68,7 (CH₂O), 113,7 (2C), 116,7, 120,7 (2C), 140,3, 148,2, 148,3, 148,4, 152,2 (C²), 160,6 (COOH), 172,7 (C=O).

Análisis Elemental de C₁₉H₂₂O₇

Calculado: C, 62,97 %; H, 6,12 %.

Encontrado: C, 62,75 %; H, 6,05 %.

5.11.1.6. Ácido 5-[5-(2-propilfenoxi)pentiloxi]-4-oxo-6-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-2-carboxílico, **14f**



Rendimiento: 53 %; sólido, pf: 145-146° C (ciclohexano).

***R_f*:** 0,4 (acetato de etilo)

IR (KBr, cm⁻¹): 3400, 3063, 2957, 2870, 2559, 1736, 1637, 1585, 1493, 1242, 1184, 970, 908.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 0,78 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₃), 1,43 (m, 4H, 2CH₂), 1,67 (m, 4H, 2CH₂), 1,83 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, CH₃), 2,44 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,84 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H, CH₂O), 4,04 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H, CH₂O), 6,49 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H, CH=), 6,65-6,77 (m, 3H, 2HAr, 1CH=), 6,97 (m, 2H, HAr), 7,21 (s, 1H, H⁵).

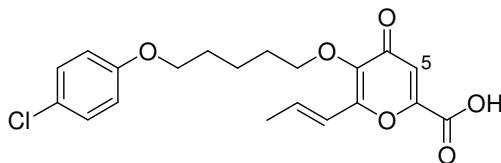
¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆, δ): 14,2 (CH₃C), 19,2 (CH₃C=), 22,7, 23,2, 29,2, 29,8, 32,5 (CH₂Ar), 67,6 (CH₂O), 72,9 (CH₂O), 111,2, 118,3, 118,7, 120,3, 126,9, 130,0, 131,3, 138,0, 143,1, 152,0, 156,7 (C⁶), 157,0 (CO), 162,0 (COOH), 177,1 (C=O).

Análisis Elemental de C₂₃H₂₈O₆

Calculado: C, 68,98 %; H, 7,05 %.

Encontrado: C, 68,19 %; H, 6,97 %.

5.11.1.7. Ácido 5-[5-(4-clorofenoxi)pentiloxi]-4-oxo-6-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-2-carboxílico, **14g**



Rendimiento: 55 %; sólido, pf: 136-137° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3500, 3076, 2943, 2914, 2872, 1732, 1647, 1630, 1597, 1581, 1541, 1493, 1473, 1443, 1286, 1244.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,48-1,60 (m, 2H, CH₂), 1,69-1,78 (m, 4H, 2CH₂), 1,87 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH₃), 3,83 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂O), 4,06 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH₂O), 6,53 (m, 1H, CH=), 6,75 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, HAr), 6,76-6,95 (m, 1H, CH=), 7,10 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, HAr), 7,26 (s, 1H, H⁵), 7,71 (sa, 1H, COOH).

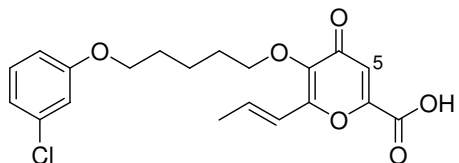
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 19,2 (CH₃), 22,5, 29,0, 28,9, 68,1 (CH₂O), 72,8 (CH₂O), 115,9 (2C), 118,3, 118,5, 125,4, 129,3 (2C), 138,2, 143,0, 151,4, 156,7 (C⁶), 157,7 (CO), 161,1 (COOH), 177,0 (CO).

Análisis Elemental de C₂₀H₂₁ClO₆

Calculado: C, 61,14 %; H, 5,35 %.

Encontrado: C, 60,93 %; H, 5,35 %.

5.11.1.8. Ácido 5-[5-(3-clorofenoxi)pentiloxi]-4-oxo-6-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-2-carboxílico, **14h**



Rendimiento: 57 %; sólido, pf: 116-117° C (acetato de etilo:éter etílico).

R_f : 0,3 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm^{-1}): 3500, 3070, 2945, 2873, 1735, 1637, 1595, 1579, 1544, 1469, 1440, 1385, 1307, 1245, 1182.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 1,75 (m, 2H, CH_2), 1,92 (m, 4H, 2CH_2), 2,09 (d, $J = 5,9$ Hz, 3H, CH_3), 4,07 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, CH_2O), 4,28 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, CH_2O), 6,74 (m, 1H, CH=), 6,92-7,08 (m, 4H, 3HAr, 1 CH=), 7,28 (t, $J = 8,5$ Hz, 1H, HAr), 7,47 (s, 1H, H^5), 8,12 (sa, 1H, COOH).

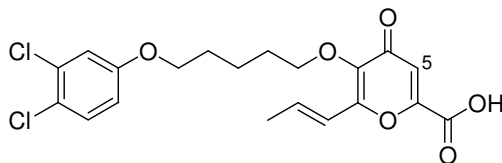
^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 18,9 (CH_3), 22,2, 28,7, 29,5, 67,8 (CH_2O), 72,5 (CH_2O), 112,8, 114,6, 118,0, 118,3, 120,5, 130,0, 134,6, 137,9, 142,7, 151,2, 156,5 (C^6), 159,6 (CO), 160,9 (COOH), 176,9 (C=O).

Análisis Elemental de $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClO}_6$

Calculado: C, 61,14 %; H, 5,35 %.

Encontrado: C, 60,57 %; H, 5,34 %.

5.11.1.9. Ácido 5-[5-(3,4-diclorofenoxi)pentiloxi]-4-oxo-6-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-2-carboxílico, **14i**



Rendimiento: 58 %; sólido, pf: 118-119° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,3 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3500, 3018, 2945, 2873, 1732, 1645, 1633, 1593, 1546, 1469, 1442.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 1,56-1,68 (m, 2H, CH₂), 1,72-1,82 (m, 4H, 2CH₂), 1,91 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH₃), 3,88 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 4,09 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, CH₂O), 6,57 (m, 1H, CH=), 6,67 (dd, *J* = 8,8; 2,9 Hz, 1H, HAr), 6,75-6,86 (m, 1H, CH=), 6,91 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, HAr), 7,18 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, HAr), 7,21 (s, 1H, H⁵), 8,21 (sa, 1H, COOH).

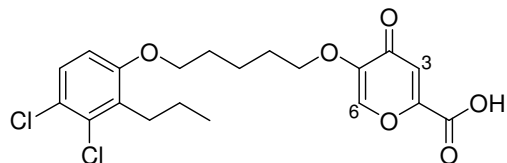
¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃, δ): 19,1 (CH₃), 22,3, 28,7, 29,6, 68,3 (CH₂O), 72,5 (CH₂O), 114,5, 116,3, 118,1, 118,5, 122,9, 127,5, 130,6, 137,9, 142,9, 151,7, 156,5 (C⁶), 158,1 (CO), 161,1 (COOH), 176,9 (C=O).

Análisis Elemental de C₂₀H₂₀Cl₂O₆

Calculado: C, 56,22 %; H, 4,72 %.

Encontrado: C, 55,58 %; H, 4,61 %.

5.11.1.10. Ácido 5-[5-(3,4-dicloro-2-propilfenoxi)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-carboxílico, **14j**



Rendimiento: 55 %; sólido, pf: 155-156° C (acetato de etilo:acetona).

***R*_f:** 0,3 (acetato de etilo)

IR (KBr, cm⁻¹): 3448, 3090, 2958, 2870, 2570, 2447, 1736, 1635, 1603, 1577, 1452, 1263, 1246, 1032, 935, 758.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 0,90 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃), 1,38-1,62 (m, 4H, 2CH₂), 1,81-1,95 (m, 4H, 2CH₂), 2,73 (tap, *J* = 8,0 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,88 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH₂O), 3,99 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H, CH₂O), 6,91 (s, 1H, H³), 7,00 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, HAr), 7,41 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, HAr), 8,28 (s, 1H, H⁶).

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆, δ): 13,7 (CH₃), 21,3, 21,9, 27,9, 28,1, 29,4 (CH₂Ar), 68,0 (CH₂O), 68,7 (CH₂O), 111,5, 116,8, 123,0, 127,8, 130,5, 131,0, 140,4, 148,5, 152,3 (C²), 155,9 (CO), 160,7 (COOH), 172,7 (C=O).

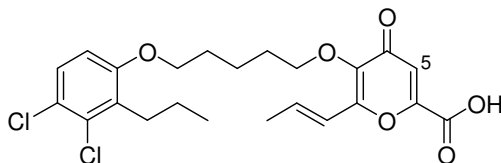
EM: 428 (M), 386, 335, 285, 225, 207, 204, 175, 157, 147, 119, 113, 78, 69 (100), 41, 39.

Análisis Elemental de C₂₀H₂₂Cl₂O₆

Calculado: C, 55,96 %; H, 5,17 %.

Encontrado: C, 56,03 %; H, 5,10 %.

5.11.1.11. Ácido 5-[5-(3,4-dicloro-2-propilfenoxi)pentiloxi]-4-oxo-6-[(1*E*)-prop-1-enil]-4*H*-piran-2-carboxílico, **14k**



Rendimiento: 57 %; sólido, pf: 161-162° C (acetato de etilo:éter etílico).

***R_f*:** 0,2 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm⁻¹): 3423, 3082, 2958, 2931, 1726, 1649, 1631, 1578, 1549, 1454, 1261, 1201, 1182, 968.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 0,72 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H, CH₃), 1,23-1,43 (m, 4H, 2CH₂), 1,53-1,63 (m, 4H, 2CH₂), 1,76 (d, *J* = 5,2 Hz, 3H, CH₃), 2,56 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, CH₂Ar), 3,82-3,91 (m, 4H, 2CH₂O), 6,38-6,55 (m, 2H, CH=), 6,69 (s, 1H, H⁵), 6,82 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, HAr), 7,26 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, HAr).

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆, δ): 13,8 (CH₃C), 18,4 (CH₃C=), 21,3, 22,1, 28,2, 28,9, 29,5 (CH₂Ar), 68,2 (CH₂O), 71,7 (CH₂O), 111,6, 117,5, 118,3, 122,7, 127,8, 130,6, 131,3, 135,5, 142,9, 151,7, 153,8 (C⁶), 156,1 (CO), 160,8 (COOH), 174,8 (C=O).

EM: 468 (M-1), 265, 251, 225, 204, 197, 181 (100), 157, 128, 111, 95, 79, 53, 42.

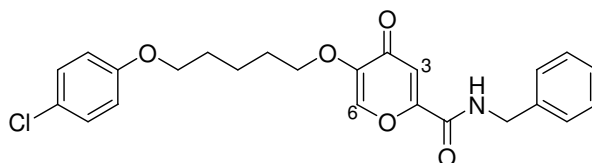
Análisis Elemental de C₂₃H₂₆Cl₂O₆

Calculado: C, 58,86 %; H, 5,58 %.

Encontrado: C, 58,77 %; H, 5,36 %.

5.11.2. Síntesis de *N*-bencil-5-[5-(4-clorofenoxi)pentiloxi]-4-oxo-4*H*-piran-2-carboxamida, **15**

En un matraz de dos bocas, bajo atmósfera de argón se introducen 0,28 mmol de **14b**, 50 μ L (0,57 mmol) de $\text{Cl}_2(\text{CO})_2$ recién destilado, 10,25 mg de *N,N*-dimetilformamida y 5,5 mL de CH_2Cl_2 . La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante dos horas. El crudo de reacción se evapora a sequedad y se redisuelve en 6 mL de CH_2Cl_2 . A continuación se añaden 45 mg (0,42 mmol) de bencilamina y la nueva mezcla de reacción se agita durante 5 horas a temperatura ambiente. El crudo resultante se diluye con acetato de etilo, se lava con agua y se extrae. La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se concentra a vacío. El producto final se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente cloroformo:metanol (100:1), aumentando gradualmente la polaridad, y posterior cristalización en cloroformo:hexano.



Rendimiento: 56 %; sólido, pf: 125-126° C (cloroformo:hexano).

R_f : 0,3 (acetato de etilo).

IR (KBr, cm^{-1}): 3423, 2947, 1732, 1637, 1602, 1569, 1469, 1282, 1207, 1122, 864.

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 1,35-1,95 (m, 6H, 3 CH_2), 3,75-3,95 (m, 4H, 2 CH_2O), 4,45 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H, CH_2N), 6,72 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H, HAr), 6,82 (ta, 1H, NH), 7,15 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H, HAr), 7,18-7,25 (m, 6H, 5HAr, H^6), 7,45 (s, 1H, H^3).

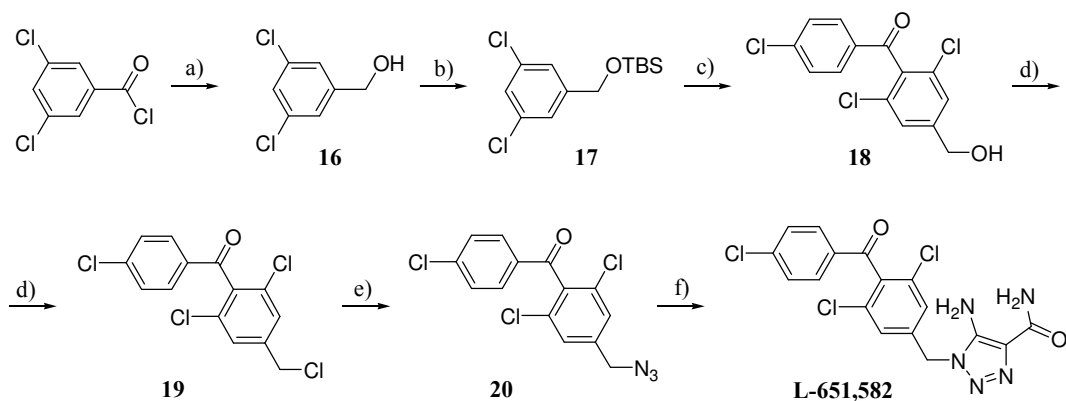
^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , δ): 22,2, 28,7, 29,6, 52,5, 62,7 (CH_2O), 67,8 (CH_2O), 115,7, 127,5, 128,0, 128,9, 129,2, 157,6 ($\text{C}=\text{O}$).

Análisis Elemental de $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{ClNO}_5$

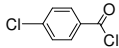
Calculado: C, 65,23 %; H, 5,44 %; N, 3,17 %.

Encontrado: C, 64,84 %; H, 5,64 %; N, 3,12 %.

5.12. SÍNTESIS DEL COMPUESTO DE REFERENCIA PARA LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS, 5-AMINO-1-[4-(4-CLOROBENZOIL)-3,5-DICLOROBENCIL]-1,2,3-TRIAZOL-4-CARBOXAMIDA (**L-651,582**)¹⁶⁶



Esquema 5.3.

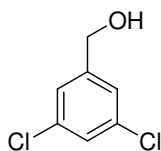
Reactivos: a) NaBH_4 / THF / NMP. b) TBSCl / Im / DMAP / DMF. c) 1. n-BuLi / THF; 2.  3. HCl / H_2O . d) SOCl_2 . e) NaN_3 / EtOH. f) $\text{NC-CH}_2\text{-CONH}_2$ / K_2CO_3 / DMSO.

5.12.1. Síntesis del alcohol 3,5-diclorobencílico, **16**

A una disolución de cloruro de 3,5-diclorobenzoylo (5 g, 23,8 mmol) en 42 mL de THF a 0° C, se le añade otra de borohidruro sódico (1,59 g, 42,0 mmol) en 10 mL de *N*-metilpirrolidinona, gota a gota y manteniendo la temperatura por debajo de 18° C. La mezcla de reacción resultante se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se le añaden 400 mL ácido clorhídrico 0,5 N y 400 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se extrae y la fase acuosa se lava con 140 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se juntan y se lavan con agua (400 mL) y con una disolución saturada de NaCl (280 mL), se secan sobre sulfato sódico, se evapora el disolvente a vacío y se obtiene un sólido cristalino. El

¹⁶⁶ Merck & Co. Inc., Chabala, J. C.; Bochis, R. J.; Fisher, M. H., US4590201, **1986**.

producto se purifica por cristalización en ciclohexano (55 mL), obteniéndose 3,2 g (75%) de **16**.

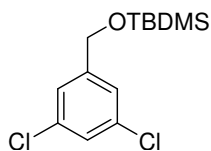


p.f.: 77-78° C (ciclohexano).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 4,99 (s, 2H, CH₂OH), 7,28 (s, 3H, HAr).

5.12.2. Síntesis de *t*-butildimetilsilil 3,5-diclorobencil éter, **17**

En un matraz de 50 mL se disuelven 2,19 g (12,4 mmol) del alcohol **16**, 2,11 g (30,9 mmol) de imidazol y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (7,5 mg, 0,06 mmol) en 4,2 mL de *N,N*-dimetilformamida, bajo atmósfera de argón. Seguidamente se añaden 1,96 g (12,9 mmol) de cloruro de *t*-butildimetilsililo y la mezcla de reacción se agita durante cuatro horas a temperatura ambiente. La reacción se sigue por c.c.f. hasta que desaparece el alcohol de partida. Al crudo de reacción se le añaden 37 mL de hexano y 47 mL de ácido clorhídrico 1N. La fase orgánica se extrae y se lava con 50 mL de ácido clorhídrico 1N y con agua (3 x 50 mL), se seca con Na₂SO₄ y se filtra. Esta disolución se emplea como reactivo de partida para el siguiente paso de reacción. Con objeto de caracterizar el compuesto **17**, se tomó una pequeña alícuota de la disolución de hexano resultante y se concentró a vacío.

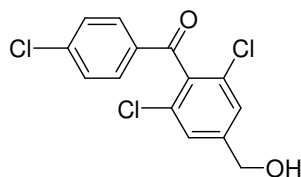


¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,00 (s, 6H, 2CH₃-Si), 0,85 (s, 9H, 3CH₃-C), 4,57 (s, 2H, CH₂O), 7,11 (s, 3H, HAr).

5.12.3. Síntesis del alcohol 3,5-dicloro-4-(4-clorobenzoil)bencílico, **18**

A la disolución de **17** en hexano se le añaden 50 mL de THF anhidro. La mezcla se concentra a vacío hasta un volumen de 25 mL, se le añaden 50 mL más de THF y se vuelve a concentrar hasta un volumen final de 35 mL. Esta disolución bajo argón, se enfría a -75°C y se añaden, gota a gota y manteniendo la temperatura por debajo de -60°C , 6,45 mL de una disolución 2,1 M (13,5 mmol) de *n*-butilitio en hexano. Después de agitar durante 30 minutos a esta temperatura la reacción se lleva a -75°C y se le añaden 1,8 mL (14,2 mmol) de cloruro de 4-clorobenzoil en 2,5 mL de THF. La mezcla de reacción se agita durante 3 horas a -60°C y se hidroliza con 1 mL de ácido clorhídrico 2 N.

A esta disolución se le añaden 2,5 mL de ácido clorhídrico concentrado y se deja que alcance la temperatura ambiente mientras se agita durante 12 horas. La reacción se sigue por c.c.f. (10 % de acetato de etilo en hexano) y, una vez finalizada se añaden 50 mL de acetato de etilo y 150 mL de agua fría. La fase orgánica se extrae y se lava con agua (75 mL), hidróxido sódico 1 N (2 x 75 mL), agua (75 mL) y ácido clorhídrico 0,1 N; se seca con Na_2SO_4 y se concentra a vacío para obtener el alcohol **18** como un sólido cristalino, que se purifica por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano, 1/3), dando lugar a 1,3 g de producto puro (33% de rendimiento desde **16**).

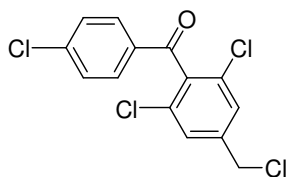


^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 2,54 (sa, 1H, OH), 4,67 (s, 2H, CH_2OH), 7,35 (s, 2H, HAr), 7,41 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, HAr), 7,67 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, HAr).

5.12.4. Síntesis de cloruro de 3,5-dicloro-4-(4-clorobenzoil)bencilo, **19**

A una disolución del alcohol **18** (80 mg, 0,253 mmol) en 0,5 mL de CH_2Cl_2 a 0°C se le añade gota a gota 1 mL de SOCl_2 recién destilado. La mezcla de reacción se agita durante 48 horas a temperatura ambiente y después se hidroliza con 0,5 mL de agua-hielo; a

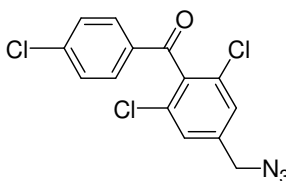
continuación se añaden 25 mL de una disolución saturada de NaHCO_3 y 25 mL de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se extrae, se lava con agua (50 mL), se seca sobre sulfato magnésico y se filtra. El disolvente se elimina a vacío y se obtiene un aceite que se purifica por cromatografía en columna, usando como eluyente una mezcla de hexano y acetato de etilo (9:1). Se obtienen de este modo 50 mg de **19**, un sólido cristalino, con un 60 % de rendimiento.



$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3 , δ): 4,49 (s, 2H, CH_2Cl), 7,37 (s, 2H, HAr), 7,40 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, HAr), 7,69 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, HAr).

5.12.5. Síntesis de la azida de 3,5-dicloro-4-(4-clorobenzoyl)bencilo, **20**

A una disolución de **19** (50 mg, 0,15 mmol) y NaI (4 mg, 0,026 mmol) en 5 mL de etanol bajo atmósfera de argón se le añaden 20,5 mg (0,31 mmol) de azida sódica. La mezcla de reacción se refluje durante 3 horas, se deja enfriar hasta que alcanza la temperatura ambiente; se vierte sobre 10 mL de agua y se extrae con éter etílico (15 mL, 3 x 5 mL). Las fases orgánicas se juntan y se lavan con 15 mL de agua, se secan sobre Na_2CO_3 y se filtran. El disolvente se elimina a vacío y se obtiene un sólido cristalino (**20**), que se emplea en el siguiente paso de reacción sin purificación.

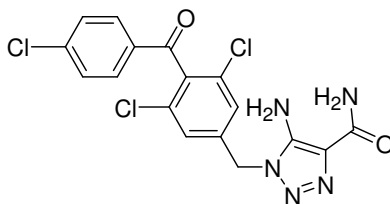


$\text{IR}(\text{CHCl}_3, \text{cm}^{-1})$: 3352, 3018, 2925, 2108, 1680, 1589, 1396, 1333, 1304, 1271, 1215, 1094.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 4,41 (s, 2H, CH₂N₃), 7,34 (s, 2H, HAr), 7,45 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, HAr), 7,73 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, HAr).

5.12.6. Síntesis de 5-amino-1-[4-(4-clorobenzoil)-3,5-diclorobencil]-1,2,3-triazol-4-carboxamida (**L-651,582**)

Se suspenden 210 mg (1,52 mmol) de carbonato potásico anhidro en 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) durante 10 minutos y a continuación se añaden 32 mg (0,39 mmol) de cianoacetamida. La mezcla se agita durante otros 10 minutos y después se añaden 132 mg (0,39 mmol) de la azida **20** en 0,4 mL de DMSO. Después de 24 horas de reacción la suspensión resultante se filtra cuidadosamente y el sólido se lava con 0,89 mL de DMSO. A la disolución de DMSO se le van añadiendo muy lentamente (durante 30 minutos) y enfriando externamente (temperatura < 30° C) 7 mL de agua. Se deja que precipite un sólido amarillo anaranjado durante la noche (15 horas a 20° C) que finalmente se filtra y se lava con agua (3,5 mL). El sólido obtenido se disuelve en 10 mL de acetato de etilo y se lava repetidas veces con agua (100 mL) para eliminar cualquier resto de DMSO. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se elimina a vacío. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna, usando acetato de etilo como eluyente. El compuesto final **L-651,582** se obtiene como un sólido cristalino.



L-651,582

Rendimiento: 55 %; pf: 202-204° C (metanol)

R_f: 0,3 (acetato de etilo)

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 5,37 (s, 2H, NH₂), 5,48 (s, 2H, CH₂N), 5,59 (sa, 1H, NH₂), 6,87 (sa, 1H, NH₂), 7,24 (s, 2H, HAr), 7,42 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, HAr), 7,69 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, HAr).

¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD, δ): 48,9, 128,4 (2C), 130,6 (2C), 132,1 (2C), 133,2, 135,2, 138,0, 141,0, 142,1, 146,8 (CONH₂), 192,3 (C=O).

EM: 425 (M), 379, 353, 199, 139 (100), 98, 63, 55.

Análisis Elemental de C₁₇H₁₂Cl₃N₅O₂.

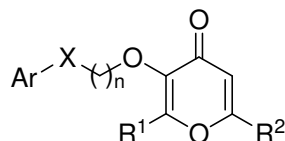
Calculado: C, 48,05%; H, 2,82%, N, 16,47%.

Encontrado: C, 48,08%; H, 3,40%, N, 15,83%.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de nuevos derivados de 4*H*-piran-4-ona de estructura general **I**.



I

2. Mediante experimentos de citotoxicidad en varias líneas celulares tanto tumorales (H460, HCT116, MDA231 y MCF7) como no tumorales (MCF10A, MRC5 y NIH3T3), se ha observado que la mayoría de los compuestos sintetizados presenta una elevada capacidad citotóxica con valores de CI₅₀ comprendidos entre 5 y 50 μM, siendo algunos compuestos capaces de inducir de forma selectiva la apoptosis únicamente en las líneas celulares tumorales.

3. Los compuestos que presentan los mejores perfiles *in vitro* muestran asimismo capacidades, de moderadas a buenas, para inhibir el crecimiento independiente de matriz. Sin embargo, sólo fueron capaces de inhibir la migración tumoral de forma moderada.

4. En la investigación del mecanismo implicado en la citotoxicidad sólo la serie 1 (ArX = fenoxi) ejerce su efecto citotóxico por inhibición directa de la proteína Ras. En el caso de la serie 2 (ArX = indol) el efecto antitumoral observado debe estar mediado por otro mecanismo.

5. Con objeto de llevar a cabo estudios cuantitativos de relación estructura-citotoxicidad en la serie 1, se ha realizado un análisis conformacional de dos compuestos representativos **8r** (ArX = 2-alil-3,4-diclorofenoxi, R¹ = H, R² = CH₂OH) y **14b** (ArX = 4-clorofenoxi, R¹ = H, R² = COOH), mediante experimentos de RMN (NOESY y HMBC).

6. Los estudios cuantitativos de relación estructura-citotoxicidad (QSAR-3D) realizados mediante la metodología CoMFA han puesto de manifiesto la influencia favorable para la citotoxicidad en la línea tumoral H460 de sustituyentes electronegativos y poco voluminosos en las posiciones 3 y 4, junto con un sustituyente alifático en la posición 2 del anillo bencénico. Con respecto al sistema de piranona, la presencia de un sustituyente en R² con un grupo con alta electronegatividad y uno de baja contribuyen favorablemente para la citotoxicidad.

7. Se ha validado el modelo CoMFA mediante el diseño y la síntesis de nuevos compuestos, que presentan los requerimientos estructurales óptimos. De entre todos ellos cabe destacar el derivado **8z** (**EHT0229**) (ArX = 3,4-dicloro-2-propilfenoxi, R¹ = H, R² = CH₂OH), el cual presenta una elevada citotoxicidad [CI₅₀ = 15 µM (H460)] y selectividad frente a la línea no tumoral ensayada MCF10A. Adicionalmente, **EHT0229** muestra una alta capacidad tanto para inhibir el crecimiento independiente de matriz como para frenar la migración tumoral, comprobándose que **EHT0229** ejerce su actividad antitumoral mediante acción directa en la proteína Ras.

8. Mediante experimentos de RMN de diferencia de transferencia de saturación y tr-NOESY se ha caracterizado el complejo **EHT0229** con la proteína Ras, constituyendo este compuesto el primer ligando no endógeno capaz de inhibir directamente la proteína Ras.

9. Teniendo en cuenta los resultados experimentales de RMN se ha realizado la simulación computacional del reconocimiento del modelo de interacción de la proteína Ras con **EHT0229**. Estos estudios podrán dirigir el desarrollo de nuevos inhibidores de la proteína Ras con un mayor grado de eficacia.

CONSEJO DE COORDINACIÓN UNIVERSITARIA
TESIS DOCTORALES
BASE DE DATOS TESEO

UNIVERSIDAD ___ UCM _____
 COD. UNIV⁷ AÑO ACADÉMICO¹ 2 0 0 3
 CENTRO DE LECTURA² ___ CIENCIAS QUÍMICAS _____

CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO³

ÁREA				LÍNEA	
	6	7	5		

ÁREA				LÍNEA	

ÁREA				LÍNEA	
2	3	0	6		

ÁREA				LÍNEA	

APELLIDOS PIÑAR PINEDO	NOMBRE M ^a DEL CARMEN
------------------------	----------------------------------

DIRECTOR

LÓPEZ RODRÍGUEZ	MARIA LUZ
-----------------	-----------

CODIRECTOR

VISO BERONDA	ALMA
--------------	------

TRIBUNAL

PRESIDENTE

ARRESTO VILAS	DIEGO
---------------	-------

VOCALES

PARDO	LEONARDO
BELIN	VICENT
JIMÉNEZ-BARBERO	JESÚS

SECRETARIO

MARTÍN LEÓN	NAZARIO
-------------	---------

AUTOR

D.N.I. O PASAPORTE	53006359 F	
APELLIDOS PIÑAR PINEDO		NOMBRE M ^a DEL CARMEN
AÑO DE NACIMIENTO	SEXO	NACIONALIDAD
1 9 7 4	H M X	ESPAÑOLA

TÍTULO POR EL QUE ACCEDE AL TERCER CICLO ⁴	AÑO ACADÉMICO DE GRADUACIÓN ⁵	AÑO ACADÉMICO COMIENZO ESTUD. TERCER CICLO ⁶	AÑO CERTIFICAC. SUFICIENCIA INVESTIGADORA
LICENCIADA	1 9 9 8	1 9 9 9	2 0 0 2
CÓDIGO TÍTULO ⁷			
UNIVERSIDAD EN LA QUE SE OBTUVO EL CITADO TÍTULO	UCM	CÓDIGO UNIVERSIDAD ⁷	

DEPARTAMENTO	QUÍMICA ORGÁNICA i
PROGRAMA DOCTORADO	QUÍMICA ORGÁNICA
CENTRO REALIZACIÓN	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CALIFICACIÓN

APROBADO	NOTABLE	SOBRESALIENTE	SOBRESALIENTE CUM LAUDE	X
----------	---------	---------------	-------------------------	---

La Base de Datos TESEO se puede consultar en Internet: <http://www.mcu.es/TESEO/teseo.html>

TÍTULO DE LA TESIS
NUEVOS DERIVADOS DE 4H-PIRAN-4-ONA INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA RAS
RESUMEN
<p>El presente trabajo de Tesis Doctoral ha consistido en el diseño, síntesis y desarrollo de nuevos compuestos derivados de 4H-piran-4-ona con propiedades antitumorales.</p> <p>Se ha determinado la capacidad citotóxica de los compuestos sintetizados en diferentes líneas celulares, con el fin de conocer tanto su actividad como su selectividad. Además, se han realizado ensayos biológicos de migración celular, crecimiento independiente de matriz y pruebas de dependencia de la vía de señalización Ras, empleando proteína Ras constitutivamente activada.</p> <p>Por otro lado, se han llevado a cabo estudios cuantitativos de relación estructura citotoxicidad (QSAR 3D), mediante la metodología del análisis comparativo del campo molecular (CoMFA), y se ha validado el modelo obtenido mediante el diseño y síntesis de nuevos compuestos. Adicionalmente, se ha caracterizado el complejo de un ligando representativo con la proteína Ras mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y simulación computacional.</p> <p>Como conclusión final de este trabajo cabe decir que se ha desarrollado un nuevo grupo de agentes antitumorales con citotoxicidades muy interesantes frente a tumores duros, que ejercen su mecanismo de acción mediante inhibición de la proteína Ras.</p>
DIRECCIÓN DEL ARCHIVO EN EL QUE QUEDA LA TESIS
Universidad Complutense de Madrid-Archivo General-Pabellón de Gobierno-C/ Isaac Peral, s/n-28040 MADRID

FIRMA DEL SECRETARIO DEL TRIBUNAL

Fecha de lectura 8 de junio de 2004

7

--	--	--	--	--	--	--	--

¹ Primer año del curso académico de lectura de la tesis (ejemplo: curso 1998/99 es el año académico 1998).

² Facultad, Escuela Superior...

³ [Ver Nomenclatura Internacional de la UNESCO para los campos de ciencia y tecnología](#). Se debe procurar no utilizar el "99" para la línea ya que esto dificultará la búsqueda informática de la tesis en TESEO.

⁴ Licenciado, Arquitecto o Ingeniero en...

⁵ Primer año del curso académico en que terminó los estudios que le dieron acceso al tercer ciclo.

⁶ Primer año del curso académico de comienzo de los estudios de tercer ciclo.

⁷ Las casillas sombreadas se cumplimentarán en el Consejo de Universidades.

ILMO. SECRETARIO GENERAL DEL CONSEJO DE COORDINACIÓN UNIVERSITARIA

CONSEJO DE COORDINACIÓN UNIVERSITARIA
TESIS DOCTORALES
BASE DE DATOS TESEO

UNIVERSIDAD ___ UCM _____
 COD. UNIV⁷ AÑO ACADÉMICO¹ 2 0 0 3
 CENTRO DE LECTURA² ___ CIENCIAS QUÍMICAS _____

CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO³

ÁREA				LÍNEA	
	6	7	5		

ÁREA				LÍNEA	

ÁREA				LÍNEA	
2	3	0	6		

ÁREA				LÍNEA	

APELLIDOS PIÑAR PINEDO	NOMBRE M ^a DEL CARMEN
------------------------	----------------------------------

DIRECTOR

LÓPEZ RODRÍGUEZ	MARIA LUZ
-----------------	-----------

CODIRECTOR

VISO BERONDA	ALMA
--------------	------

TRIBUNAL

PRESIDENTE

ARRESTO VILAS	DIEGO
---------------	-------

VOCALES

PARDO	LEONARDO
BELIN	VICENT
JIMÉNEZ BARBERO	JESÚS

SECRETARIO

MARTÍN LEÓN	NAZARIO
-------------	---------

AUTOR

D.N.I. O PASAPORTE	53006359 F	
APELLIDOS PIÑAR PINEDO		NOMBRE M ^a DEL CARMEN
AÑO DE NACIMIENTO	SEXO	NACIONALIDAD
1 9 7 4	H M X	ESPAÑOLA

TÍTULO POR EL QUE ACCEDE AL TERCER CICLO ⁴	AÑO ACADÉMICO DE GRADUACIÓN ⁵	AÑO ACADÉMICO COMIENZO ESTUD. TERCER CICLO ⁶	AÑO CERTIFICAC. SUFICIENCIA INVESTIGADORA
LICENCIADA	1 9 9 8	1 9 9 9	2 0 0 2
CÓDIGO TÍTULO ⁷			
UNIVERSIDAD EN LA QUE SE OBTUVO EL CITADO TÍTULO	UCM	CÓDIGO UNIVERSIDAD ⁷	

DEPARTAMENTO	QUÍMICA ORGÁNICA i
PROGRAMA DOCTORADO	QUÍMICA ORGÁNICA
CENTRO REALIZACIÓN	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CALIFICACIÓN

APROBADO		NOTABLE		SOBRESALIENTE		SOBRESALIENTE CUM LAUDE	X
----------	--	---------	--	---------------	--	-------------------------	---

La Base de Datos TESEO se puede consultar en Internet: <http://www.mcu.es/TESEO/teseo.html>

TITLE
NEW DERIVATIVES OF 4 <i>H</i> -PIRAN-4-ONE AS INHIBITORS OF RAS PROTEIN
SUMMARY
<p>The present Ph. D. work has been focused on the design, synthesis and development of new derivatives of 4<i>H</i>-piran-4-one with antitumoral properties.</p> <p>We have determined the citotoxic activity of the synthesized compounds in different cellular lines in order to determine not only their activities, but also their selectivity. Moreover, we have designed several biologic assays of cellular migration, anchorage independent growth and Ras signaling pathway dependence.</p> <p>On the other hand, we have carried out quantitative structure-citotoxicity relationship studies (QSAR 3D), using the comparative molecular field analysis (CoMFA). The obtained model has been validated by the design and synthesis of new compounds. Also, we have characterized the representative ligand-Ras protein complex by nuclear magnetic resonance (NMR) and computational simulation.</p> <p>In conclusion, in this work we have developed a new group of antitumoral agents with high citotoxic potencies against aggressive tumors by inhibition of the Ras protein.</p>
DIRECCIÓN DEL ARCHIVO EN EL QUE QUEDA LA TESIS
Universidad Complutense de Madrid-Archivo General-Pabellón de Gobierno-C/ Isaac Peral, s/n-28040 MADRID

FIRMA DEL SECRETARIO DEL TRIBUNAL

Fecha de lectura ____ de ____ de 2004

7

--	--	--	--	--	--	--	--

¹ Primer año del curso académico de lectura de la tesis (ejemplo: curso 1998/99 es el año académico 1998).

² Facultad, Escuela Superior...

³ [Ver Nomenclatura Internacional de la UNESCO para los campos de ciencia y tecnología](#). Se debe procurar no utilizar el "99" para la línea ya que esto dificultará la búsqueda informática de la tesis en TESEO.

⁴ Licenciado, Arquitecto o Ingeniero en...

⁵ Primer año del curso académico en que terminó los estudios que le dieron acceso al tercer ciclo.

⁶ Primer año del curso académico de comienzo de los estudios de tercer ciclo.

⁷ Las casillas sombreadas se cumplimentarán en el Consejo de Universidades.

ILMO. SECRETARIO GENERAL DEL CONSEJO DE COORDINACIÓN UNIVERSITARIA